



Rôle des cellules B régulatrices dans l'immunodépression induite par le choc septique

Morgane Gossez

► To cite this version:

Morgane Gossez. Rôle des cellules B régulatrices dans l'immunodépression induite par le choc septique. Immunologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1017 . tel-02422224

HAL Id: tel-02422224

<https://theses.hal.science/tel-02422224>

Submitted on 21 Dec 2019

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 : 2019LYSE1017

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé N° 205

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, biologie, santé
Discipline : Immunologie

Soutenue publiquement le 14 février 2019, par :
Morgane GOSSEZ-COULAUD

Rôle des cellules B régulatrices dans l'immunodépression induite par le choc septique

Devant le jury composé de :

Pr DIGNAT GEORGE Françoise Professeure des Universités – Praticien Hospitalier, *Aix-Marseille Université/Assistance publique – Hôpitaux de Marseille* (Rapporteur)

Pr ASEHNOUNE Karim Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, *Université de Nantes/CHU de Nantes* (Rapporteur)

Pr CARCELAIN Guislaine Professeure des Universités - Praticien Hospitalier, *Université Paris Diderot/Assistance publique – Hôpitaux de Paris* (Examinatrice)

Dr PAIDASSI Hélène Chargée de recherche CNRS, *Université Claude Bernard Lyon 1/Centre International de Recherche en Infectiologie* (Examinatrice)

Pr MONNERET Guillaume Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, *Université Claude Bernard Lyon 1/Hospices Civils de Lyon* (Directeur de thèse)

Dr VENET Fabienne Maître de Conférences - Praticien Hospitalier, *Université Claude Bernard Lyon 1/Hospices Civils de Lyon* (Co-directrice de thèse)

REMERCIEMENTS

Voici la deuxième thèse, la « grande » thèse, la « thèse de SVT »... bref la thèse de doctorat !

Officiellement elle clôture mes études supérieures, commencées en septembre 2005. Un long chemin parcouru depuis la lecture des Enfants de la terre (Jean M. Auel) qui m'avait poussée à m'engager dans les études de pharmacie pour l'herboristerie... Rapidement j'ai abandonné cette idée car j'ai découvert la recherche, une façon pour moi de participer à l'avancée de la médecine et de la science, et de me sentir moins inutile face aux maux qui peuvent parfois toucher des êtres chers. J'ai commencé mon internat avec l'envie de faire de l'hématologie ou de la parasitologie, tout en rigolant avec mes proches sur le fait que je décrocherais un jour le Prix Nobel pour la découverte du vaccin contre le VIH. Au final, pas d'hémato, pas de parasito, pas de Prix Nobel, mais un an de recherche à Oxford sur le VIH et une passion pour le système immunitaire à la complexité et l'ingéniosité fascinantes. La thèse de doctorat était la dernière condition obligatoire pour devenir chercheur, mais pour devenir celui dont j'ai toujours rêvé, il me reste beaucoup à apprendre. Pour tout le chemin parcouru et pour tout celui qui reste, je remercie mes proches, qu'ils soient famille, amis, collègues ou mentors, pour leur confiance, leurs conseils, leur bienveillance et leur soutien. C'est en vous que je puise ma force et mon envie, c'est grâce à vous que je me construis chaque jour et pour cela je ne peux que le répéter, MERCI.

Aux membres du jury.

Aux **Pr Karim Asehnoune** et **Pr Françoise Dignat George**, un grand merci pour l'intérêt porté à mon travail et d'avoir accepté de l'évaluer.

Au **Pr Guislaine Carcelain**, je vous remercie de me faire l'honneur de juger pour la deuxième fois mon travail et de l'enseignement que je tirerai de nos discussions.

Au **Dr Hélène Paidassi**, merci pour ta participation à ma thèse mais également pour les moments enrichissants partagés à l'animalerie et l'aide que tu n'hésites jamais à m'apporter à chaque fois que je te sollicite.

A ceux qui m'ont aidé à me construire professionnellement et à ceux que j'admire.

A **Hubert Lincet**, merci d'avoir accepté en stage d'initiation à la recherche « la râleuse parce qu'elle a l'air d'en vouloir » et m'a ainsi permis de découvrir la recherche en deuxième année de pharmacie. C'est là que tout a commencé.

A **Olivier Jardin**, merci de m'avoir aussi bien accueillie à la pharmacie de Bavent et de m'avoir fait confiance lors des stages passés chez vous, merci également pour votre philosophie de vie.

A **Patrick Lecacheur**, merci de m'avoir laissé ma chance à la pharmacie « parce que tu es ceinture noire de taekwondo », malgré mon inexpérience. Merci d'avoir répété pendant une année, que malgré le fait que je puisse « vendre du sable dans le désert », vous n'aviez aucun doute sur mon choix de carrière et ma réussite à l'internat.

A **Christophe, Françoise et Julien**, merci pour chaque jour passé au laboratoire à vos côtés, riches d'enseignements, de partage et de moments de joie. Merci d'avoir mis votre confiance en moi, de m'avoir fait une place dans l'équipe et de croire en moi. Merci notamment de m'avoir soutenu tout au long de cette thèse et particulièrement ces derniers mois, sans votre aide je n'en serai pas là. Merci du fond du cœur.

To **John Frater**, thanks for welcoming me in your lab, within the prestigious Oxford University, without knowing me at all. Thanks for everything you taught me, about science but also management and the use of R software, although I cursed you several times for this reason ^^ . You impressed me with you speaker talent, your curiosity about everything and your fairness. You trusted me with my work, and made me understand for the first time that I was capable and would be good at it, allowing me to speak in a prestigious congress and offering a PhD project in your team. This year in Oxford made me grow up a lot and confirmed that I wanted to become a researcher. Thank you for the example you gave me.

A **Fabienne**. Merci de partager cette aventure et ce projet si passionnant avec moi. J'ai énormément évolué depuis le début de cette thèse, sur le plan expérimental, recherche mais aussi personnel. On a fait du chemin toutes les deux je crois. Chaque jour, j'apprends un peu plus à tes côtés. Merci d'écouter mes idées, de m'arrêter quand je veux aller trop vite, de me guider. Merci pour le papotage, les fous rires, les confidences. Merci surtout de croire en moi, de m'inclure dans tes projets futurs, de me faire prendre confiance et de partager un peu de cette force que tu as en toi. Merci pour ta girlpower attitude, de me montrer le chemin. Grâce à toi je sais que j'y arriverai.

A **Guillaume**. Je vous remercie pour le plaisir que j'ai à travailler au laboratoire. En effet, équipe super, recherche au top, mais ça ne suffirait pas sans un bon chef d'orchestre. Je vous remercie de l'exemple que vous me donnez chaque jour en termes d'humilité, de connaissances scientifiques, de curiosité, de clairvoyance, de justesse et de bienveillance. Je vous remercie pour votre disponibilité à toutes mes sollicitations, notamment lors de l'écriture de cette thèse. Je vous remercie de la confiance que vous avez mise en moi il y a quelques années pour ce poste hospitalo-universitaire, j'espère en être toujours digne. Merci de croire en moi et de me guider pas à pas.

A mes très chers collègues

A **Cathy et Cathy, Laurence, Anne, Alysée, Christelle, Agnes, Claudia** et les « petits nouveaux » **Mireille et Florian**. Je pense aussi à ceux qui ont fait partie de l'équipe et partis vers de nouveaux horizons de boulot ou de retraite : **Sandrine, Françoise, Brigitte, Céline, Patrick, Claude**. Merci pour la super équipe que vous faites (ou avez fait !), pour vos sourires quotidiens, vos petits mots gentils et réconfortants, pour toute l'aide que vous m'avez apporté dans ce travail de thèse, pour les rigolades, pour votre honnêteté, pour votre soutien, et pour l'intérêt que vous portez à notre travail quotidien.

A **Alexandra**, la reine des souris, je te remercie pour le plaisir que j'ai de travailler avec toi, pour ton engouement pour notre projet, pour ta gentillesse et ton amour des animaux.

Au **Dr David Kryza** et au **Pr Florence Morfin**, merci de m'avoir suivie tout au long des comités de suivi de thèse, merci pour vos conseils précieux et votre bienveillance.

Je remercie aussi toutes les autres personnes avec qui je travaille, les réanimateurs, les ARC, les membres de Biomérieux, Thibaut le roi du CyTOF et tous les autres. Je remercie bien sur les patients sans qui notre travail ne serait pas envisageable.

A mes amis géniaux.

A mes copines d'amour : **Carole, Stouf, Auror, Paulinette, Seubine, Dédé**. Merci les filles d'être toujours là, pour les bons comme les mauvais moments. Particulièrement, je vous remercie pour vos conseils et votre soutien ces deux dernières années. Avec vous, je sais que je peux refaire le monde, me retrouver avec des tracts pour Mélenchon distribués par BHL, faire des soirées télé bitchage Bachelor et Miss France, comparer le sex-appeal de Kit Harington et Will Smith, faire des grosses fêtes arrosées comme des soirées tisanes de mémé, parler de futurs bébés comme de trucs censurés, être féministe, être écolo, être moi quoi... Merci d'être fières de moi. Merci aussi car je sais que vous n'hésitez pas à me donner des coups de pied au cul quand j'en aurai besoin !

A mes réanimateurs pseudo-parigots adorés **Solenn, Clément et Charles**, merci pour les mois passés au labo ensemble, merci de comprendre ma passion des plasmocytes et de l'immuno, pour les discussions scientifiques et médicales. Mais je vous remercie surtout d'être devenus de vrais amis, pour les soirées quinoa, les omelettes parisiennes ou les dégustations de mezcal !

A la team Croix-Roussienne/Caluirarde/St-Genois **Dien, Isa, Nadège, Guillaume, Cédric et Anne**, je vous remercie pour tous les bons moments que l'on passe ensemble, d'être toujours partants pour faire des tas de sorties, pour votre gentillesse et générosité et pour vos personnalités toutes singulières mais qui forment tellement une bonne équipe !

A tous les autres copains : merci aux +1 adorés, **J-Sex, Vinçou, Geo, Auré, Livier** et **Ando**, notamment d'alimenter les conversations des soirées meufs hehe ; merci à la team internat **Clemence, Marion** et **Anaëlle** ; merci aux Normands ou ex-Normands **Bibou, Julie, Elo, Pierrot, Isaure**, pour les moments que l'on prend régulièrement ensemble et le plaisir que l'on a à se retrouver à chaque fois ; merci aux **ex du tae** reconvertis en charlatan chinois, maman pétale et barman de cantina, vous vous reconnaitrez^^ ; merci aux potos lyonnais **Titou, Aurore, JB, Audrey, Matt, Thomas, Madie, Nénette, Brazz, Sarah, Thomas, Polo** et **Mel** pour tous les moments passés ensemble ; et enfin thanks to Matt, Leo and Gen, you were my PhD student models, I am so proud of you and I am so happy that we still keep in touch !

A ma famille

A **Tonton, Hugo, Cathy, Georges, Zita, Jérôme, Isa** et tous les cousins. Merci pour cette petite famille qui chaque jour m'inspire, notamment dans mon travail. Quand on prend du recul, on ne s'étonne pas que je sois à cette place maintenant, chacun d'entre vous m'inspire par son parcours et sa force. Je souhaite tous vous remercier pour les bons moments que l'on passe ensemble, même s'ils sont trop rares à mon goût. Merci pour votre ouverture d'esprit, pour votre gentillesse, votre générosité, votre courage. Merci d'être fiers de ce que je fais. Merci du modèle que vous m'apportez tous.

A **Mamie**, qui me soutient dans mes rêves, dans chacune de mes pensées, qui veille sur moi.

A **toute la famille Coulaud**, je vous remercie d'être une fois de plus présents à une étape importante de ma vie, de vous intéresser à ce que je fais, pour tous les moments passés ensemble, pour votre compréhension dans les moments plus difficiles.

A **Antoine**, que j'espère retrouver bientôt.

A **Papa** et **Maman**. Le sacrifice le plus lourd pour ce choix de carrière et cette thèse a été de m'éloigner de vous. Je ne vous le dirai jamais assez, mais sachez que j'en suis aujourd'hui ici grâce à vous. Chaque jour vous me rendez fière d'être votre fille, ce qui me pousse à me dépasser. Je ne suis pas fière dans le sens « mes parents sont PDG et chirurgien cardiaque », non je suis fière de vos actes de vie quotidienne, de tout ce que vous m'avez enseigné depuis des années, de l'amour infini que vous me portez, de la capacité que vous avez à donner tout sans rien attendre en retour à part le bonheur de ceux que vous aimez. Je vous remercie pour les moments ensemble ces dernières années, synonymes à chaque fois de joie et de répit pour moi. Je vous remercie pour votre soutien sans faille, vos mots apaisants, votre amour, votre respect. Je vous aime tant.

A **Alban**. Tu as vécu cette thèse autant que moi. Le CyTOF, les souris CLP et les plasmogènes régulateurs n'ont plus de secret pour toi. Pendant ces trois années, tu as partagé ma passion et mon excitation quand je t'expliquais mes résultats. Tu m'as donné des conseils avisés et tu m'as secourue quand tout ne se passait pas bien. De ton œil extérieur, tu n'as pas toujours pris mon parti, tu as challengé mes idées, tu connais mes faiblesses et m'a permis de les affronter. Tu m'as organisé des surprises, tu m'as réconfortée, tu nous as bâti un nid douillet. Pour la première fois aussi tu m'as vu brisée, et c'est toi qui m'as donné la force et montré la possibilité de m'aider du travail qui me passionne pour me relever. Ces trois années sont un condensé des 16 ans passés à me construire à tes côtés, grâce à ton respect, ton amour et ton honnêteté. Tu m'as toujours laissé la liberté de suivre mes rêves, mes passions, malgré les sacrifices. Pour tout ça, je ne te remercierai jamais assez, j'espère seulement t'apporter autant que tu le fais. Alors cette thèse je te la dédie, tu l'attends depuis longtemps. Elle signe un nouveau chapitre pour moi dans ma carrière, mais également un nouveau chapitre dans nos vies. Je n'oublie pas nos projets évoqués sous une nuit étoilée de Zanzibar.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	- 15 -
LISTE DES TABLEAUX	- 17 -
LISTE DES ABREVIATIONS	- 18 -
INTRODUCTION	- 23 -
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 27 -
I. LE SEPSIS.....	- 29 -
A. Définition.....	- 29 -
B. Diagnostic	- 32 -
C. Epidémiologie	- 33 -
A. Etiologies et facteurs de risque	- 39 -
B. Prise en charge clinique et thérapeutique	- 41 -
II. PHYSIOPATHOLOGIE	- 45 -
A. Réponse inflammatoire initiale	- 45 -
B. Immunodépression induite par le sepsis	- 52 -
C. Traitement personnalisé du sepsis par thérapies immunostimulantes.....	- 64 -
III. FOCUS SUR LES LYMPHOCYTES B	- 73 -
A. Physiologie des lymphocytes B.....	- 73 -
B. Les cellules B régulatrices.....	- 90 -
C. Les lymphocytes B dans le sepsis	- 109 -
IV. CONCLUSION	- 115 -
OBJECTIF ET PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE.....	- 117 -
RESULTATS	- 121 -
ARTICLE 1 : CARACTERISATION DU STATUT DES LYMPHOCYTES B AU COURS DE L'IMMUNODEPRESSION INDUITE CHEZ LES PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE	- 123 -
A. Contexte et objectif.....	- 123 -
B. Description et principaux résultats de l'étude	- 123 -
C. Conclusion	- 123 -
ARTICLE 2 : UTILISATION DE LA CYTOMETRIE DE MASSE POUR CARACTERISER LES ALTERATIONS IMMUNITAIRES INDUITES CHEZ LES PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE	- 125 -
A. Contexte et objectif.....	- 125 -
B. Description et principaux résultats de l'étude	- 125 -
C. Conclusion	- 126 -

ARTICLE 3 : MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DE CELLULES B REGULATRICES AU COURS DE L'IMMUNODEPRESSION INDUITE PAR LE SEPSIS	- 127 -
A. Contexte et objectif.....	- 127 -
B. Mise en place d'un modèle murin d'immunodépression induite par le sepsis	- 128 -
C. Mise en évidence et caractérisation de cellules B régulatrices au cours de l'immunodépression induite par le sepsis.....	- 134 -
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	- 145 -
CONCLUSION	- 157 -
ANNEXES	- 161 -
ANNEXE 1.....	- 165 -
ANNEXE 2.....	- 167 -
ANNEXE 3.....	- 169 -
ANNEXE 4.....	- 171 -
ANNEXE 5.....	- 173 -
ANNEXE 6.....	- 175 -
ANNEXE 7.....	- 177 -
ANNEXE 8.....	- 179 -
REFERENCES	- 181 -

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Relation entre le sepsis, l'infection et le SIRS.....	30
Figure 2. Six défaillances d'organes sont principalement surveillées lors d'un sepsis.....	32
Figure 3. Conduite à tenir pour un diagnostic de sepsis devant un patient présentant une infection.....	33
Figure 4. Incidence et mortalité du sepsis dans certains pays européens.....	34
Figure 5. Incidence et mortalité du sepsis sévère.....	35
Figure 6. Mortalité en service de réanimation et proportion attribuable aux infections secondaires chez les patients admis pour un sepsis.....	36
Figure 7. Niveau de sensibilisation de la population générale dans différents pays.....	37
Figure 8. Le sepsis sévère engendre des séquelles fonctionnelles à long terme.....	38
Figure 9. Hypothèses successives de la réponse inflammatoire développée au cours du sepsis.....	46
Figure 10. Localisation et spécificité des PRR.....	47
Figure 11. Récepteurs intra et extracellulaires responsables de la reconnaissance des composants microbiens et des signaux de danger.....	47
Figure 12. Réseau inflammatoire du sepsis.....	48
Figure 13. Modifications de la barrière endothéliale au cours du sepsis.....	49
Figure 14. Lien entre système du complément et coagulation.....	50
Figure 15. Altérations immunitaires post-septiques des principales populations leucocytaires.....	56
Figure 16. Caractéristiques des principales sous-populations lymphocytaires T CD4.....	59
Figure 17. Réponse immunitaire dans les contextes de cancer et d'infection chronique.....	65
Figure 18. Effet du traitement par IL-7 sur la numération des lymphocytes T CD4 et CD8 chez des patients en choc septique.....	68
Figure 19. Développement des lymphocytes B-2 dans la moelle osseuse.....	77
Figure 20. Stades de maturation des lymphocytes B chez l'homme.....	78
Figure 21. Signaux de différenciation vers les cellules mémoires dans les réponses thymo-indépendantes.....	80
Figure 22. Réponse lymphocytaire B thymo-dépendante.....	82
Figure 23. Réponse thymo-indépendante des lymphocytes B de la zone marginale chez l'homme....	83
Figure 24. Réponse thymo-dépendante des lymphocytes B de la zone marginale chez la souris.....	85
Figure 25. Rôles d'APRIL et BAFF dans l'activation lymphocytaire B.....	87
Figure 26. Modèle de survie des plasmocytes dans une niche médullaire.....	90
Figure 27. Proportion et nombre de B10 dans la rate en fonction de l'âge de souris B10.....	97
Figure 28. Développement et activation des fonctions effectrices des B10.....	100

Figure 29. Théories du développement des plasmocytes régulateurs.....	107
Figure 30. Comparaison de l'expression du HLA-DR à la surface des lymphocytes B chez des patients développant ou non un sepsis sévère en post-traumatisme	110
Figure 31. Conséquences du sepsis sur les caractéristiques des lymphocytes B.....	113
Figure 32. Principe de la recherche translationnelle inversée.....	127
Figure 33. Protocole du modèle murin d'immunodépression induit par le sepsis.....	129
Figure 34. Suivi du poids, score de gravité et mortalité après la chirurgie.....	130
Figure 35. Augmentation du taux de TNF- α plasmatique induite par la CLP.....	131
Figure 36. Altérations fonctionnelles des splénocytes induites par la CLP.....	131
Figure 37. Lymphopénie et augmentation de la proportion des Tregs spléniques induites par la CLP.....	133
Figure 38. Absence d'inhibition de prolifération des lymphocytes T par les lymphocytes B de souris CLP.....	134
Figure 39. Peu de modifications phénotypiques des lymphocytes B après le sepsis.....	135
Figure 40. Plasmocytose splénique induite par la CLP.....	136
Figure 41. Inhibition de prolifération des lymphocytes T par les plasmocytes de souris CLP.....	137
Figure 42. Levée partielle de l'inhibition de prolifération des lymphocytes T par les plasmocytes en absence de contact cellulaire.....	138
Figure 43. Potentiels mécanismes immunorégulateurs par contact cellulaire direct.....	139
Figure 44. Potentiels mécanismes immunorégulateurs par la synthèse d'IL-10.....	140
Figure 45. Absence de plasmocytes régulateurs « naturels » Lag-3 ⁺	140
Figure 46. Surexpression de PD-L1 sur les plasmocytes des patients en choc septique.....	142
Figure 47. Surexpression du HLA-DR par les plasmocytes des patients en choc septique.....	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Critères diagnostic du sepsis 2 chez les adultes.....	31
Tableau 2. Facteurs de risque de développer un sepsis.....	40
Tableau 3. Essais cliniques visant la réponse inflammatoire du sepsis.....	51
Tableau 4. Liste non-exhaustive de molécules candidates à l'immunothérapie du sepsis.....	66
Tableau 5. Biomarqueurs biologiques de l'immunodépression induite par le sepsis.....	71
Tableau 6. Caractéristiques des principales populations de lymphocytes B.....	75
Tableau 7. Phénotypes particuliers associés aux cellules B régulateurs.....	108
Tableau 8. Modèles murins expérimentaux de sepsis et leurs équivalents cliniques.....	128
Tableau 9. Critères d'évaluation du score de gravité.....	129
Tableau 10. Altérations immunitaires caractérisant l'immunodépression induite par le sepsis.....	133
Tableau 11. Synthèse des premiers résultats montrant la présence de plasmocytes lors de la phase d'immunodépression induite par le sepsis dans le modèle murin et chez les patients en choc septique.....	143

LISTE DES ABREVIATIONS

AB/C : Antibody bound per cell
ADN : Acide désoxyribonucléique
APACHE : Acute Physiology and Chronic Health Disease Classification System
APRIL : A proliferation-inducing ligand
ASC : Antibody secreting cell
ATP : Adenosine triphosphate
BACH2 : BTB Domain And CNC Homolog 2
BAFF : B-cell activating factor
BAFF-R : BAFF receptor
Bcl-2/6 : B-cell lymphoma 2/6
BCMA : B-cell maturation antigen
BCR : B-cell receptor
Blimp-1 : B lymphocyte-induced maturation protein-1
Bregs : Lymphocytes B régulateurs
BTK : Bruton tyrosine kinase
BTLA : B- and T-lymphocyte attenuator
CCR2 : C-C chemokine receptor 2
cDC : Cellule dendritique conventionnelle
CCL : Chemokine ligand
CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée
CLP : Ponction et ligature caecales
CLR : C-type lectin receptor
CpG : Dinucléotide Cytosine-Guanine
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR : Récepteur au chémokines du type CXCL
DAMPS : Damage-associated molecular patterns
DC : Cellule dendritique
EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
Ebi3 : Epstein-Barr Virus Induced protein 3
FasL : Fas ligand

FcγR : Récepteur du fragment Fc des IgG

Flt3 : Fms-like tyrosine kinase 3

FoxP3 : Forkhead Box P3

GATA3 : GATA Binding Protein 3

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GITR : Glucocorticoid induced TNFR-related receptor

GLUT1 : Glucose transporter type 1

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HIF1α : Hypoxia-inducible factor 1α

HLA : Antigène leucocytaire humain

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

iNKT : Invariant natural killer T cell

IL : interleukine

IRA-B : Lymphocyte B activateur de la réponse innée

IRAKM : Interleukin receptor associated kinase M

IRF4/8 : Interferon regulatory factor 4/8

IV : Intraveineux

KLF2 : Krüppel-like Factor 2

Lag-3 : Lymphocyte-activation gene 3

LFA1 : Lymphocyte function-associated antigen 1

LPS : Lipopolysaccharide

MALT : Tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MAP : Pression artérielle moyenne

MCL1 : Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1

MDSC : Myeloid-derived suppressor cell

MHC : Complexe majeure d'histocompatibilité

mHLA-DR : HLA-DR monocytaire

MIP-1α : Macrophage Inflammatory Protein -1α

mTOR : Mammalian target of rapamycin

Myd88 : Myeloid differentiation primary response 88

MZ-B : Lymphocyte B de la zone marginale

NF-AT : Nuclear factor of activated T-cells

NF-κB : Nuclear factor-κB

NK : Lymphocyte natural killer

NLR : Nucleotide oligomerization domain like receptor

NOTCH2 : Neurogenic locus notch homolog protein 2

OBF1 : OCT-Binding Factor 1

OCT2 : Organic Cation Transporter 2

OMS : Organisation mondiale de la santé

P53 : Suppresseur de tumeur p53

PAMPS : Pathogen-associated molecular patterns

PAX5 : Paired box protein 5

PD-1 : Programmed death-1

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PD-L1/2 : Programmed death-ligand 1/2

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

PNN : Polynucléaire neutrophile

Pregs : Plasmocytes régulateurs

ProB10 : Progéniteurs des lymphocytes B10

PRR : Pattern Recognition Receptor

qSOFA : quick SOFA

RLR : Retinoic acid-inducible gene-I like receptor

ROR γ t : Retinoid-related orphan receptor γ t

S1P : Sphingosine-1-phosphate

SCCM : Society of Critical Care Medicine

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

SEP : Sclérose en plaque

SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique

SNA : Système nerveux autonome

SOFA : Sequential Organ Failure Assessment

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

TAC1 : Transmembrane activator and CAML interactor

T-bet : T-box transcription factor

TCR : T cell receptor

Tfh : Lymphocyte T auxiliaire folliculaire

TGF- β : Transforming growth factor β

Th : Lymphocyte T CD4 helper (ou auxiliaire)

Tim-1/3 : T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-1/3

TLR : Toll-like receptor

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

Tr1 : Lymphocyte T régulateur synthétisant de l'IL-10

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

Tregs : Lymphocytes T régulateurs

VCAM1 : Vascular cell adhesion protein 1

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VLA4 : Very late antigen 4

XBP1 : X-box binding protein 1

ZBTB20 : Zinc finger and BTB domain-containing protein 20

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le sepsis est un problème majeur de santé au niveau mondiale du fait de son incidence croissante et de sa mortalité importante. En termes de physiopathologie, afin de limiter la réponse inflammatoire initiale (responsable de défaillances d'organes), des mécanismes régulateurs se mettent en place. Ces derniers peuvent induire chez certains patients des altérations immunitaires participant à la survenue d'une profonde immunodépression, objectivée par un risque accru d'infections secondaires et de décès. Dans ce contexte, des thérapeutiques immunostimulantes sont actuellement testées. Le succès de cette stratégie thérapeutique repose sur l'identification de cibles thérapeutiques pertinentes ainsi que de biomarqueurs permettant l'individualisation des traitements et leur monitoring. Ainsi, la description exhaustive des altérations immunitaires induites par le sepsis est primordiale.

Les lymphocytes B sont des acteurs clés de la réponse anti-infectieuse (production d'anticorps, synthèse de cytokines, présentation antigénique). Des données récentes révèlent l'existence de lymphocytes B / plasmocytes immunorégulateurs dans différents contextes cliniques, notamment dans des modèles murins d'infection. Pourtant, le rôle des cellules B a peu été étudié au cours du sepsis, particulièrement dans le développement de l'immunodépression.

Ainsi, **l'hypothèse de ce travail de thèse était que des lymphocytes B / plasmocytes régulateurs pouvaient être impliqués dans l'établissement de l'immunodépression induite par le sepsis.**

Ce travail est composé de plusieurs études. Nous avons d'abord caractérisé le statut phénotypique et fonctionnel des lymphocytes B chez les patients en choc septique (**Article #1, Journal of Immunology 2018**). En parallèle, nous avons évalué la cytométrie de masse comme outil potentiel d'analyse multidimensionnelle des altérations immunitaires chez les patients (**Article #2, Scientific Reports 2018**). Enfin, nous avons exploré l'existence éventuelle de cellules B régulatrices dans un modèle murin de sepsis (**Article #3, en préparation**). Avant la description détaillée des travaux de recherche, une revue de la littérature est présentée en première partie de ce manuscrit. Elle expose d'abord les connaissances actuelles sur l'épidémiologie, la prise en charge et la physiopathologie du sepsis. Ensuite, elle présente un rappel sur la physiologie des lymphocytes B, l'état des connaissances actuelles sur les cellules B régulatrices et les données disponibles sur le statut et le rôle des lymphocytes B dans le sepsis.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE SEPSIS

A. Définition

1) Sepsis-1

Dans les années 1980, le sepsis est défini comme la *réponse systémique à une infection*. Au fil des années, des termes tels que « bactériémie », « septicémie », « syndromes septiques » et « choc septique » font leur apparition et se voient même employés dans des contextes non-infectieux. L'hétérogénéité et la diversité des termes utilisés en pratique clinique rendent l'interprétation des résultats des études cliniques difficile. Dans ce contexte, en 1991, une conférence de consensus Nord-Américaine pose les fondations de la définition du sepsis afin d'en homogénéiser le diagnostic, le suivi et la prise en charge thérapeutique. Le sepsis doit alors être suspecté lorsqu'une infection documentée est associée à une réaction inflammatoire appelée « syndrome de réponse inflammatoire systémique » (SIRS) ¹. Le SIRS est évoqué devant au moins deux des critères suivants :

- Hyperthermie > 38°C ou hypothermie < 36°C
- Tachycardie > 90 /min
- Polypnée > 20 /min ou PaCO₂ < 32 mmHg
- Hyperleucocytose > 12 000 /μL ou leucopénie < 4 000 /μL ou > 10% polynucléaires immatures

Le terme « septicémie » ne doit plus être utilisé et celui de « bactériémie » réfère seulement à la présence de pathogènes dans le sang. La conférence de consensus bannit le terme « syndromes septiques » et décrit plutôt différents stades de sévérité du sepsis : un sepsis est considéré comme « sévère » quand celui-ci est compliqué d'une dysfonction d'organe, de signes d'hypoperfusion (oligurie, acidose lactique, troubles de la conscience) ou d'une hypotension artérielle. Enfin, en cas d'administration de médicaments vasopresseurs ou d'hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat, on parle de « choc septique ». Ces critères sont largement utilisés dans les années 90, notamment dans un effort de standardisation des critères d'inclusion des études cliniques (**Fig.1**).

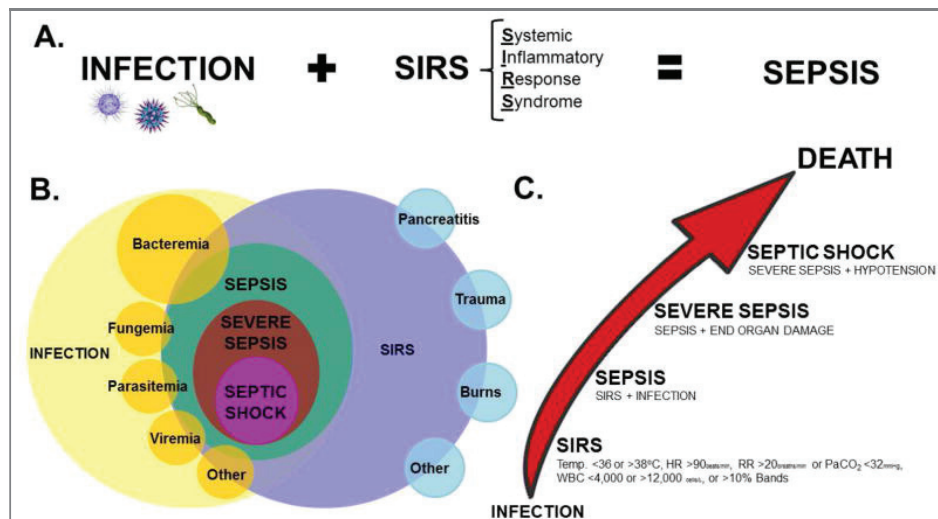


Figure 1. Relation entre le sepsis, l'infection et le SIRS ²

2) Sepsis-2

En 2001, les experts de l'American College of Chest Physicians et de la Society of Critical Care Medicine (SCCM) soulèvent les limites de ces définitions, peu précises et ne reflétant pas les connaissances physiopathologiques du sepsis ³. En effet, les critères cliniques utilisés pour définir le SIRS (*e.g.* fièvre, hyperleucocytose, tachycardie) peuvent accompagner n'importe quelle infection peu sévère et refléter une réponse bénéfique de l'hôte. Par ailleurs, de nombreux contextes cliniques peuvent être associés au SIRS (choc hémorragique, ischémie, pancréatite, brulures, traumatisme...) (**Fig.1**). Ainsi, la sensibilité du SIRS est beaucoup trop élevée, puisque la plupart des patients hospitalisés en unité de soins intensifs satisfont aux critères de SIRS, sans forcément présenter une infection concomitante. Enfin, ces critères cliniques sont peu efficaces à discriminer les différents profils possibles de réponse de l'hôte. Certains paramètres biochimiques et immunologiques augmentés chez les patients présentant un SIRS (*e.g.* concentrations plasmatiques d'interleukine (IL)-6, de CD14 soluble, de « macrophage inflammatory protein-1 α » semblent pertinents pour refléter la réponse inflammatoire systémique. Pourtant, par manque de données épidémiologiques robustes sur ces marqueurs de l'inflammation, les experts se contentent d'ajouter à la précédente définition quelques critères cliniques et biologiques plus caractéristiques de l'origine infectieuse du SIRS et de la dysfonction d'organe (**Tableau 1**). Dans cette nouvelle définition, la documentation de l'infection n'est plus obligatoire pour le diagnostic de sepsis si l'infection est suspectée, rendant primordiale l'exclusion d'autres situations engendrant un SIRS.

Tableau 1. Critères diagnostic du sepsis 2 chez les adultes³

Infection documented or suspected, and some of the following:	
General variables	Fever (core temperature >38.3°C) Hypothermia (core temperature <36°C) Heart rate > 90 /min or > 2 SD above the normal value for age Tachypnea Altered mental status Significant edema or positive fluid balance (>20 mL/kg over 24 hrs) Hyperglycemia (plasma glucose >120 mg/dL or 7.7 mmol/L) in the absence of diabetes
Inflammatory variables	Leukocytosis (WBC count > 12,000 /μL) Leukopenia (WBC count < 4,000 /μL) Normal WBC count with > 10% immature forms Plasma C-reactive protein >2 SD above the normal value Plasma procalcitonin > 2 SD above the normal value
Hemodynamic variables	Arterial hypotension (SBP <90 mmHg, MAP <70, or an SBP decrease >40 mmHg) SvO ₂ >70% Cardiac index >3.5 L/min/m ³
Organ dysfunction variables	Arterial hypoxemia (PaO ₂ /FIO ₂ <300) Acute oliguria (urine output <0.5 mL/kg/hr or 45 mmol/L for at least 2 hrs) Creatinine increase >0.5 mg/dL Coagulation abnormalities (INR >1.5 or aPTT >60 secs) Ileus (absent bowel sounds) Thrombocytopenia (platelet count <100,000 /μL) Hyperbilirubinemia (plasma total bilirubin >4 mg/dL or 70 mmol/L)
Tissue perfusion variables	Hyperlactatemia (>1 mmol/L) Decreased capillary refill or mottling

WBC, white blood cell; SBP, systolic blood pressure; MAP, mean arterial blood pressure; SvO₂, mixed venous oxygen saturation; INR, international normalized ratio; aPTT, activated partial thromboplastin time.

3) Sepsis-3

Ces dernières années, des avancées considérables ont été faites dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis, de sa prise en charge et de son épidémiologie, amenant à reconsidérer sa définition. Ces données ont renforcé les limites de la définition Sepsis 2, utilisant des critères inadaptés en termes de spécificité et de sensibilité diagnostiques. En particulier, l'hétérogénéité des critères utilisés pour le diagnostic du SIRS dans le cadre d'un sepsis sont en partie responsables des divergences dans les résultats des études cliniques et épidémiologiques, et freinent donc les avancées thérapeutiques.

En 2016, **le sepsis** est donc redéfini par la SSCM et l'European Society of Intensive Care Medicine comme une **défaillance d'organe menaçant le pronostic vital et liée à une dérégulation de la réponse de l'hôte face à une infection** ⁴. La notion de SIRS disparaît de cette définition. Le terme « sepsis sévère » est jugé redondant et ne doit plus être employé. Enfin, **le choc septique** est décrit comme un sepsis présentant des anomalies majeures circulatoires, cellulaires et métaboliques, conduisant à un risque de mortalité plus élevé que le sepsis seul. Il doit être évoqué chez un **patient nécessitant un traitement vasoactif pour maintenir une tension artérielle > 65 mmHg et présentant une lactatémie > 2 mM en l'absence d'hypovolémie**.

Ainsi, la notion de dérégulation de la réponse de l'hôte est maintenant clairement énoncée dans la nouvelle définition, reflétant les avancées importantes de ces dernières années dans la

compréhension de la physiopathologie du sepsis et notamment la mise en évidence du rôle majeur des phénomènes d'hyper-inflammation et d'immunodépression induits par le sepsis.

B. Diagnostic

D'après Sepsis-3, le diagnostic de sepsis doit faire rechercher d'éventuelles défaillances d'organes chez tout patient suspecté d'infection. L'ensemble des organes peuvent être affectés au cours du sepsis. Néanmoins, six dysfonctions d'organe prédominent, faisant apparaître des symptômes différents en fonction de l'organe impliqué, comme illustré sur la **figure 2**.

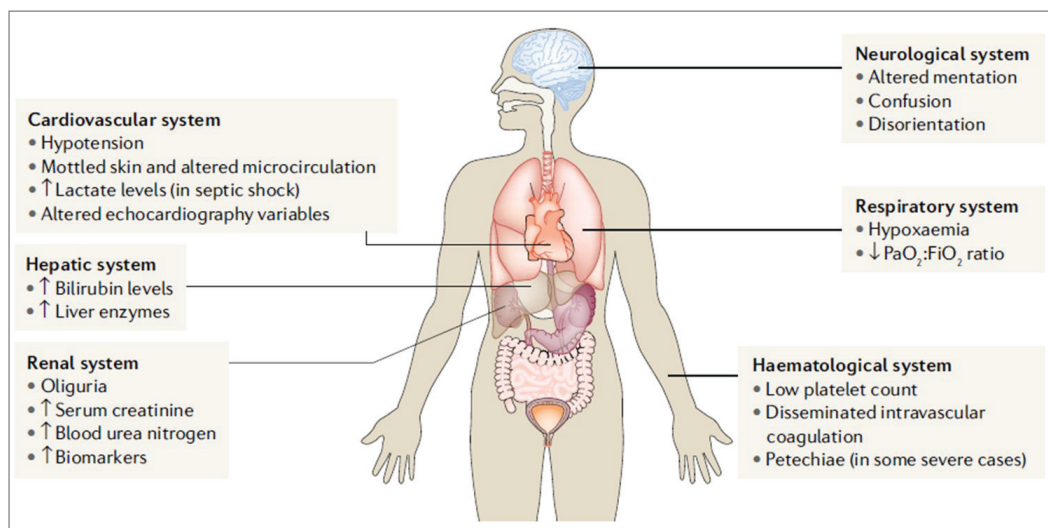


Figure 2. Six défaillances d'organes sont principalement surveillées lors d'un sepsis ⁵

Les nouvelles recommandations préconisent d'évaluer les dysfonctions d'organe par le score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) ⁶. En dehors des services de réanimation, *e.g.* à l'admission aux urgences, un « quickSOFA » (qSOFA) peut être utilisé pour dépister rapidement les patients à risque de sepsis : fréquence respiratoire > 22/min, troubles de la conscience, tension artérielle < 100 mmHg. Un protocole de prise en charge d'un patient suspect de sepsis est proposé afin de limiter le délai avant le diagnostic et améliorer les issues cliniques (**Fig.3**). Il est à noter que malgré son importance dans la physiopathologie du sepsis, le statut immunitaire du patient n'est pas pris en compte dans le diagnostic, ni ultérieurement dans la prise en charge et le suivi du patient.

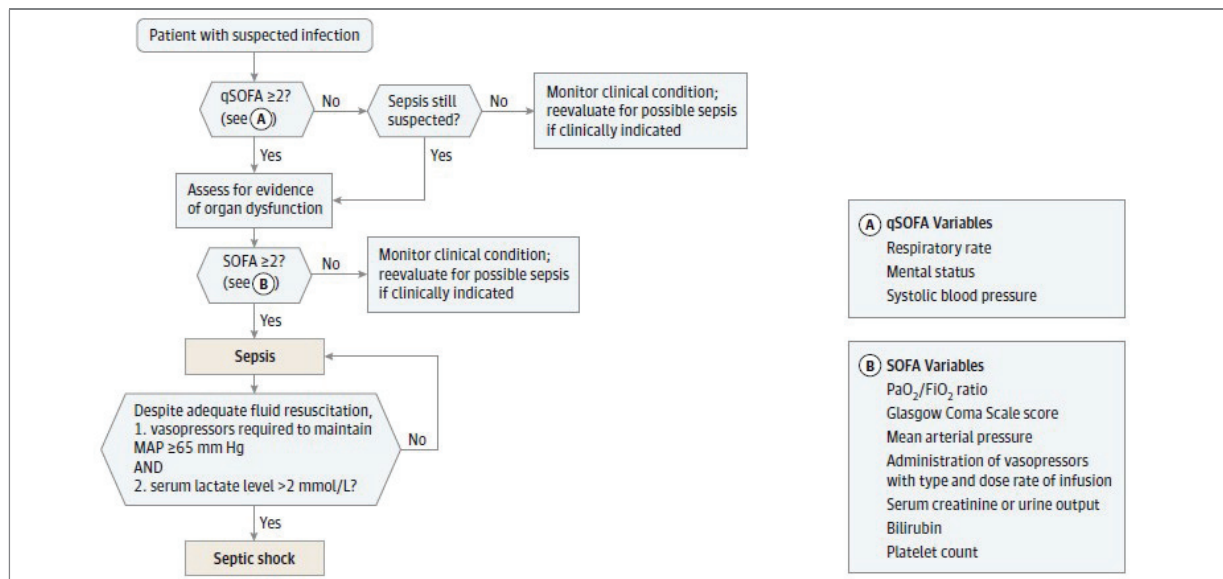


Figure 3. Conduite à tenir pour un diagnostic de sepsis devant un patient présentant une infection ⁴

Le score SOFA basal, avant l'infection, doit être de zéro, à moins que le patient ne présente une dysfonction d'organe aiguë ou chronique pré-existante. MAP : Pression artérielle moyenne

C. Épidémiologie

Le sepsis est un problème de santé publique majeur au niveau mondial. Il a ainsi été reconnu comme priorité de santé publique par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2017 ⁷. Les données épidémiologiques sont limitées, notamment du fait de l'importante hétérogénéité des définitions du sepsis employées dans les différentes études, et de la rareté des données issues des pays en voie de développement ⁸. Des recommandations basées sur les données épidémiologiques pour une prise en charge standardisée n'ont vu le jour que récemment, ce qui se reflète par des taux de mortalité variables entre les pays, corrélés au niveau d'expertise et l'expérience des centres de soin ⁹. Ainsi, une disparité importante en termes d'incidence et de mortalité est observée entre les pays (**Fig.4**), et l'ampleur réelle du sepsis demeure méconnue ^{8,9}.

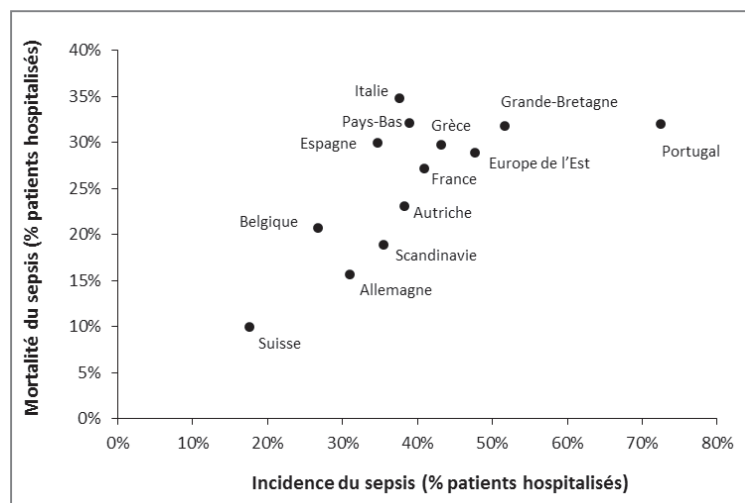


Figure 4. Incidence et mortalité du sepsis dans certains pays européens ⁹

1) Incidence

Le nombre de patients hospitalisés pour un sepsis dans les pays industrialisés est **en constante augmentation** depuis 1979 (**Fig.5A**), avec un taux moyen entre 2003 et 2015 de 437 cas pour 100 000 personnes /an ⁸. Aux USA, le taux d'hospitalisation pour un sepsis a dépassé celui des infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux et des cancers du sein et du colon ^{8,10}. En France, la proportion de patients hospitalisés en réanimation et présentant un sepsis sévère ou choc septique a augmentée d'environ 6 à 14% entre 1995 et 2013 ¹¹⁻¹⁴. Brun-Bruissson *et al.* ont extrapolé leurs résultats à l'ensemble de la population française, estimant l'incidence du sepsis sévère à 95 cas/100 000 habitants par an. Ceci est supérieur à l'incidence réunie des cancers du poumon et colorectaux (53,7 et 36,4 cas/100 000 habitants par an respectivement; données 2017 Santé Publique France)¹². L'incidence accrue du sepsis peut être expliquée par le vieillissement de la population associée à une hausse des comorbidités, l'augmentation de l'utilisation des chimiothérapies, des immunosuppresseurs et du matériel invasif, ainsi que par un meilleur diagnostic du sepsis ^{4,15}. Néanmoins, la mesure de l'incidence dans de nombreuses études est basée sur les définitions de 1991 confondant sepsis et infection, ou sur des données codées lors des hospitalisations en vue des remboursements des frais médicaux. Ainsi, l'augmentation d'incidence observée pourrait être surestimée et partiellement refléter des conditions de remboursement plus favorables dans certains pays. Les études épidémiologiques se basant sur des critères cliniques et sur les définitions de Sepsis-3 sont ainsi jugées plus pertinentes ¹⁶⁻¹⁸. Au final, **en extrapolant ces données aux pays en voie de développement, le sepsis toucherait plus de 30 millions de personnes dans le monde** dont près de 20 millions de sepsis sévères ^{8,18}.

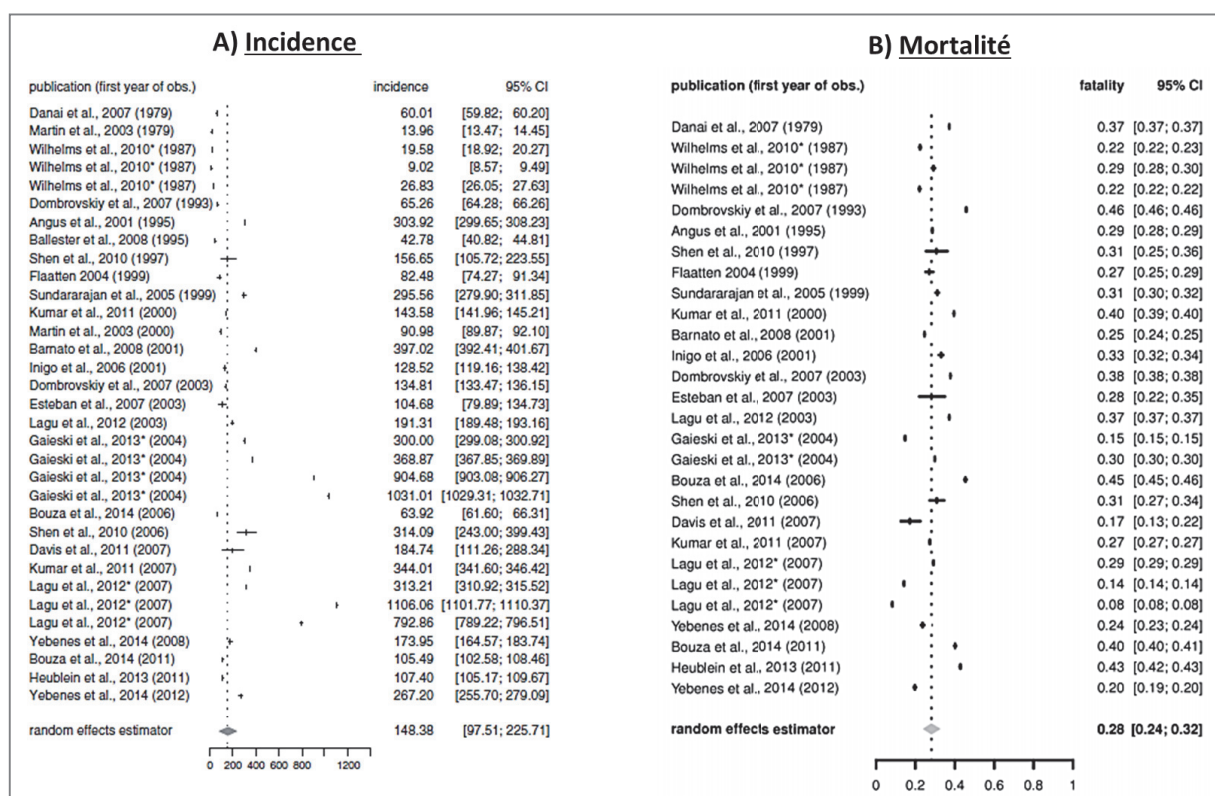


Figure 5. Incidence et mortalité du sepsis sévère¹⁹

Entre 1979 et 2012, taux d'incidence (A) et de mortalité (B) des sepsis sévères reportés dans les études disponibles au niveau mondial. Les taux d'incidence sont exprimés pour 100 000 personnes-année et le taux de mortalité pour 100 cas de sepsis sévères.

2) Mortalité

Dans les pays industrialisés, le taux de mortalité du sepsis varie entre 5 et 46% dans les formes les plus sévères (Fig.5B). Les décès précoces sont principalement attribuables aux défaillances d'organes observés dans les premiers jours après le sepsis, alors que les décès tardifs reposent essentiellement sur des complications secondaires, notamment le développement d'infections nosocomiales liées à l'immunodépression sous-jacente (Fig.6A et B). Selon les études, ces infections affectent entre 15 et 25% des patients en choc septique²⁰⁻²².

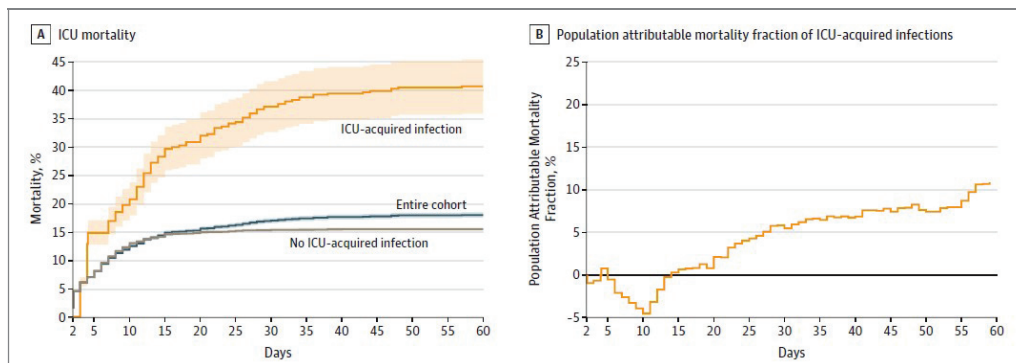


Figure 6. Mortalité en service de réanimation et proportion attribuable aux infections secondaires chez les patients admis pour un sepsis ²²

(A) Taux de mortalité des patients septiques en fonction du temps après admission en réanimation.

(B) Mortalité attribuable aux infections secondaires, après ajustement sur le score de gravité APACHE et l'âge. L'augmentation de cette proportion au cours du temps reflète (i) l'importance des décès indépendants des infections nosocomiales dans les 15 premiers jours après le sepsis, attribuables notamment aux défaillances d'organe et (ii) la sortie plus précoce des patients ne développant pas d'infections secondaires du service de réanimation

Néanmoins, on assiste depuis plusieurs années à une diminution de la mortalité. En France, le taux de mortalité dans les 28 jours après admission en service de réanimation pour sepsis sévère ou choc septique est passé d'environ 60% à 40% entre 1995 et 2013 ^{11-14,20}. La mortalité est comparable à celle du cancer du poumon, cancer présentant le plus fort taux de mortalité en France (données 2017 Santé Publique France). Cette baisse de la mortalité s'explique principalement par une meilleure compréhension de la physiopathologie du sepsis, qui a conduit à l'amélioration de la prise en charge des patients: meilleur diagnostic, prise en charge plus rapide, thérapeutique plus appropriée ⁹. Ainsi, le nombre de décès liés aux complications des défaillances d'organe a diminué, et la majorité des décès est maintenant liés aux complications tardives du choc septique ²⁰. **Si ces données sont extrapolées aux pays en voie de développement, le sepsis serait responsable de plus de 5 millions de décès par an dans le monde**, c'est-à-dire qu'une personne décèderait de sepsis toutes les 4 secondes ¹⁹. De plus, il faut noter que les améliorations citées ci-dessus concernent les pays industrialisés majoritairement. Ainsi, étant donné la prévalence élevée des pathologies infectieuses à risque de sepsis (paludisme, dengue, infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)...) et leur mortalité importante dans les pays en voie de développement par rapport aux pays industrialisés, ces chiffres de mortalité sont très probablement sous-estimés.

Les nouvelles définitions de sepsis auront peut-être un impact sur l'épidémiologie du sepsis dans les années à venir. En effet, Sterling *et al.* se sont intéressés à comparer la mortalité des patients présentant un choc septique en fonction de la définition employée ²³. Sur 470 patients présentant un choc septique selon les définitions de 2001, 42,5% seulement étaient considérés en choc septique avec les nouveaux critères Sepsis-3. La sévérité traduite par le score SOFA était plus

importante dans ce sous-groupe, ainsi que le taux de mortalité qui atteignait 29% contre 14,4% chez les autres patients de la cohorte. Les critères Sepsis-3 paraissent donc plus restrictifs et permettront d'obtenir des cohortes de patients plus homogènes, utiles pour les futurs essais cliniques et la compréhension de la physiopathologie du sepsis. En revanche, cette étude met en évidence le fait que selon ces nouveaux critères, certains patients ne seront plus considérés comme présentant un choc septique, alors qu'ils sont associés à une sévérité et mortalité non négligeables. Ainsi, la nouvelle définition pourrait altérer la qualité et la rapidité de la prise en charge de cette catégorie de patients.

3) Sensibilisation du grand public

Malgré son incidence croissante et sa gravité, le grand public est beaucoup moins sensibilisé au sepsis que d'autres pathologies telles que l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux ou les cancers du sein. Les pays reportant un niveau élevé de sensibilisation du public sont ceux qui ont mis en place des campagnes de sensibilisation spécifiques du sepsis comme le programme "Sepsis Kills" en Australie ou la campagne "Just ask: 'could it be sepsis?'" au Royaume-Uni (Fig.7) ^{24,25}. L'amélioration des connaissances du public vis-à-vis notamment des symptômes associés au diagnostic du sepsis est primordial puisqu'il a été montré qu'une prise en charge rapide et efficace est bénéfique sur les issues du sepsis ^{26,27}. La tâche s'avère néanmoins plus délicate que pour la reconnaissance de pathologies comme l'infarctus du myocarde ou les accidents vasculaires cérébraux, le sepsis ne présentant pas de signes distinctifs tels que les douleurs de poitrine ou les paralysies faciales. La reconnaissance du sepsis comme priorité de santé publique par l'OMS en 2017 fait espérer une prise de mesures à grande échelle par les autorités gouvernementales pour améliorer la prévention, le diagnostic et la prise en charge du sepsis.

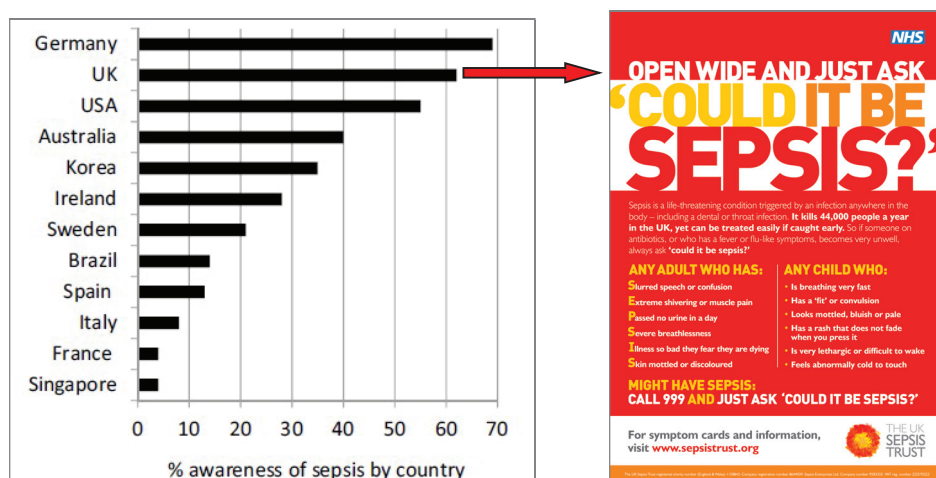


Figure 7. Niveau de sensibilisation de la population générale dans différents pays ²⁵

Et campagne de sensibilisation du système de santé nationale (National Health Service) du Royaume-Uni

4) Coût de la prise en charge des patients septiques

Les défaillances d'organe associées au sepsis, ainsi que les fréquentes infections secondaires et réactivation virales observé après un épisode septique entraînent une prise en charge en unité de soins intensifs longue et coûteuse. En 1995 aux Etats-Unis, la durée de séjour moyen des patients hospitalisés pour sepsis sévère était de 19,6 jours pour un coût moyen de 22 100 dollars. Ceci correspondait à une dépense nationale annuelle de 16,7 milliards de dollars ²⁸. En 2011, la septicémie est la pathologie avec la prise en charge la plus onéreuse aux USA, représentant 5,2% des dépenses totales de l'hôpital, soit plus de 20 milliards de dollars ²⁹. En France, les patients atteints de sepsis sévère présentent une durée médiane de séjour en service de réanimation de 10 jours et une durée médiane d'hospitalisation totale de 23 jours. Cette prise en charge engendre un coût moyen de 21 000 euros par patient ³⁰.

Cette charge économique est probablement sous-estimée. En effet, certaines données laissent à penser que les individus ayant présenté un sepsis présenteront des séquelles physiques, psychologiques et cognitives au long cours qui auront un impact social et médical non négligeables (**Fig.8**) ³¹. De même, des données récentes suggèrent une augmentation de l'incidence des cancers chez les patients ayant survécu à un sepsis, *e.g.* cancers du côlon, thyroïde et prostate ³². Ces complications à long terme engendrent un surcoût de prise en charge global non négligeable.

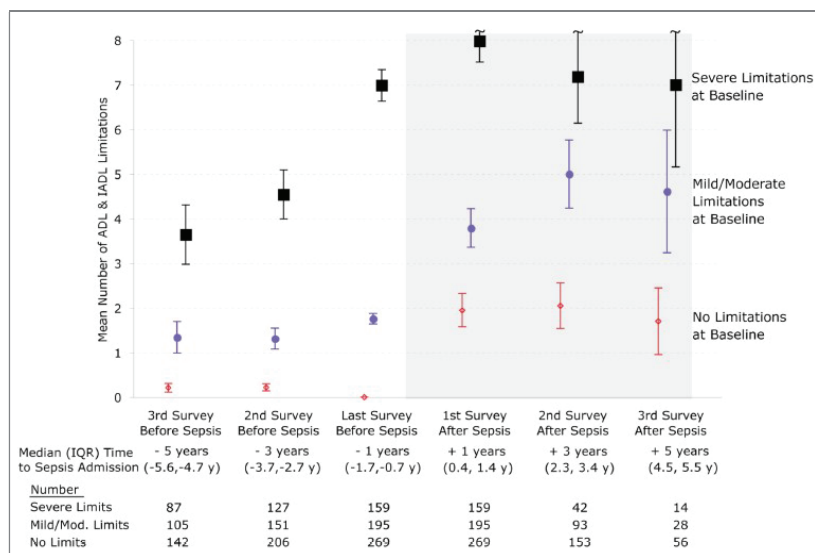


Figure 8. Le sepsis sévère engendre des séquelles fonctionnelles à long terme ³¹

Les patients ont été suivis avant (fond blanc du graphique) et après le sepsis sévère (fond gris du graphique). Le nombre moyen (et IC95%) de limitations fonctionnelles est représenté en ordonnée pour chaque groupe de patients. En rouge, violet et noir sont regroupés respectivement les patients sans limitation fonctionnelle, avec une limitation fonctionnelle moyenne ou importante préexistante avant le sepsis. Les patients sans limitation fonctionnelle préexistante développent des séquelles fonctionnelles perdurant jusqu'à 5 ans après l'épisode de sepsis sévère. Au contraire, les patients ayant acquis des limitations fonctionnelles au cours des années antérieures sont beaucoup moins impactés.

A. Etiologies et facteurs de risque

1) Etiologies

Aux Etats-Unis et en Europe, les infections pulmonaires sont la première cause de sepsis sévère ou choc septique, représentant environ 50% des cas ³³. Aux USA, les portes d'entrée urinaires et abdominales arrivent en 2^{ème} et 3^{ème} positions respectivement alors qu'en Europe les infections abdominales sont plus fréquentes que les infections urinaires ³⁴. 2/3 des infections sont d'origine communautaires ^{11,14,35}. Le germe en cause est identifié seulement dans 2 cas sur 3. Les bacilles gram négatifs sont le plus souvent impliqués, dans 40 à 60% des cas de sepsis, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les cocci gram positifs sont la deuxième cause de sepsis, principalement *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* ^{11,14,33}. Enfin, les infections à champignons voient leur incidence augmenter, représentant jusqu'à 20% des germes impliqués ^{36,37}. Moins fréquemment, certains virus peuvent être observés dans des cas de sepsis sévères, comme lors des épidémies de grippe ³⁸.

2) Facteurs de risque

Certains **facteurs de risque du sepsis** sont bien décrits : âges extrêmes de la vie (nouveau-nés et personnes âgées), origine africaine et sexe masculin (**Tableau 2**). L'utilisation de procédures invasives entraîne également un risque accru, notamment la ventilation mécanique et la pose de cathéters. Les comorbidités telles que les pathologies chroniques et une immunodépression préexistante sont associées à un risque augmenté. Ainsi, plus de 50% des patients avec un sepsis sévère présentent au moins une comorbidité associée. Enfin, les chirurgies non programmées, entraînant des périodes d'hospitalisation longues et portant sur la sphère abdominale, sont plus à risque d'entraîner un sepsis secondaire ^{37,39,40}. Les mesures préventives dans ces populations à risque sont primordiales et passe notamment par la vaccination et des règles hygiéno-diététiques telles que le maintien d'une activité physique régulière, une alimentation saine et le traitement local rigoureux des plaies. La prévention du sepsis chez les personnes hospitalisées est plus délicate et passe par la diminution de la durée du séjour à l'hôpital et de la limitation de l'utilisation de dispositifs invasifs.

Les **facteurs influençant la gravité du sepsis** sont moins bien décrits. Le risque de défaillance d'organe serait dépendant de l'ethnie, de l'agent infectieux en cause, du site d'infection, de la préexistence d'atteintes d'organe et de la rapidité de prise en charge du patient ^{33,41}. Les déterminants du risque de décès précoce seraient l'âge, les cancers, le diabète, l'absence d'identification du pathogène en cause et la gravité initiale ²⁰. Les facteurs influençant le risque de décès tardif incluraient l'âge, les cirrhoses, l'absence d'identification du pathogène, et les traitements antérieurs par corticoïdes ²⁰. Les comorbidités telles que les pathologies chroniques et une immunodépression pré-existante sont péjoratives pour l'issue clinique ¹⁴, l'origine de

l'immunodépression sous-jacente ayant potentiellement un impact sur les complications non-infectieuses et la mortalité du sepsis ⁴².

Le **risque de développer des infections nosocomiales** est augmenté chez les patients sous ventilation mécanique ou équipés de voies veineuse centrales ²², chez les patients présentant un choc septique d'origine communautaire ²¹, et chez les patients avec les tableaux cliniques initiaux les plus sévères ²². La présence d'une immunodépression préexistante ne paraît pas associé à un risque accru d'infections secondaires ⁴².

Enfin, **les caractéristiques génétiques de l'hôte** pourraient influencer à la fois l'incidence, l'issue du sepsis et l'efficacité des traitements, notamment au niveau de gènes codant pour les protéines impliquées dans la physiopathologie du sepsis telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, les antigènes des leucocytes humains (HLA = complexe majeur d'histocompatibilité, CMH), le CD14 et les récepteurs de type Toll (TLR) ^{43,44}. Elles ne paraissent pas associées au risque d'infections secondaires ²². L'impact du polymorphisme génétique reste débattu, puisque les résultats sont inconsistants selon les études notamment à cause de l'hétérogénéité des populations étudiées ^{33,45,46}.

Tableau 2. Facteurs de risque de développer un sepsis ^{18,39}

Age	< 2 ans > 55 ans
Pathologies chroniques	Cancer Diabète de type I Bronchopneumopathie chronique obstructive Cirrhose ou obstruction biliaire Pathologie rénale chronique Insuffisance cardiaque Connectivites Obésité
Thérapeutique affectant l'immunité	Transplantation Chimiothérapie Radiothérapie Immunosuppresseurs Transfusions sanguines
Lésion des barrières naturelles	Traumatisme Chirurgie Cathétérisme ou intubation Brûlures Entérocolites
Infections chroniques	VIH Infections urinaires Pneumonies Infections cutanées
Autres	Malnutrition, déficit en vitamine D Alcoolisme chronique

B. Prise en charge clinique et thérapeutique

Des efforts sont fait depuis de nombreuses années afin d'optimiser et homogénéiser la prise en charge du sepsis et du choc septique. En effet, des disparités entre pays peuvent en partie expliquer les différences observées en terme d'issues cliniques et de mortalité ³⁴. Dans ce sens, des recommandations internationales ont récemment été publiées dans la « Surviving Sepsis Campaign » de 2016 ⁴⁷. Ces recommandations reconnaissant le sepsis comme une urgence médicale, imposant une hospitalisation immédiate en unité de réanimation. Son traitement s'organise autour de deux enjeux principaux : pallier aux défaillances d'organes et éliminer la source infectieuse. Cet effort de standardisation de la prise en charge du sepsis est nécessaire et indispensable. Néanmoins, les recommandations sont encore jugées perfectibles par les cliniciens et devront être mises à jour régulièrement selon les données des études récentes ⁴⁸. Seules les recommandations basées sur des preuves considérées les plus solides sont présentées ci-dessous (« recommandations fortes »).

1) Traitement antimicrobien et contrôle de la porte d'entrée

Des hémocultures et prélèvements microbiologiques spécifiques du site anatomique d'infection suspecté doivent être prélevés avant l'initiation de l'antibiothérapie, seulement si cela ne retarde pas l'instauration du traitement. En effet, un traitement empirique large spectre doit être débuté par voie IV le plus précocement possible, dans l'heure suivant la suspicion de sepsis. Il doit couvrir l'ensemble des pathogènes suspectés (bactéries mais aussi potentiellement champignons et virus en fonction du contexte). Le choix des molécules sera guidée par

- le site anatomique suspect d'être source de l'infection
- les profils de résistance des pathogènes fréquents au sein de la communauté et de l'hôpital
- la présence de déficits immunitaires tels que neutropénie, splénectomie, VIH, déficit en immunoglobulines (Ig)...
- l'âge, les comorbidités et la présence de matériel invasif chez le patient
- le risque de résistance liée à un précédent séjour à l'hôpital, une antibiothérapie récente ou un portage de Bactéries Multi Résistantes connu.

Une antibiothérapie ciblée sera mise en place dès que possible lors de l'identification du germe en cause. Dans 1/3 des cas, l'agent infectieux impliqué n'est pas retrouvé. La restriction de l'antibiothérapie pourra alors être guidée par l'amélioration clinique.

Enfin, l'identification rapide du site anatomique de l'infection est primordiale afin de mettre en place des mesures spécifiques pour contrôler la source infectieuse : drainage d'un abcès, débridement d'une plaie nécrotique, retrait des dispositifs intra-vasculaires potentiellement infectés, résolution d'une perforation gastro-intestinale ...

2) Stabilisation hémodynamique

Stabiliser l'hypotension artérielle et l'hypoperfusion tissulaire induites par le sepsis est une des urgences principales de la prise en charge du sepsis. Ces troubles se traduisent par des défaillances d'organes aiguës, notamment rénales et cardiovasculaires, et une augmentation de la lactatémie. Un remplissage vasculaire par perfusion intraveineuse (IV) de cristalloïdes à une dose d'au moins 30 mL/kg est recommandé dans les 3 premières heures. L'expansion volémique initiale sera ensuite ajustée par une réévaluation fréquente du statut hémodynamique du patient et de la réponse au traitement. Cette réévaluation inclut l'examen clinique ainsi que différents paramètres physiologiques tels que la fréquence cardiaque, la pression artérielle, la saturation artérielle en oxygène, la fréquence respiratoire, la température corporelle et la diurèse. L'emploi d'hydroxyéthylamidons n'est pas recommandé.

Lorsque l'emploi de vasopresseurs est nécessaire, la tension artérielle à cibler initialement est de 65 mmHg. La norépinephrine (= noradrénaline) est à utiliser en première intention. Son effet vasoconstricteur permet l'augmentation de la tension artérielle sans importante modification de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique, contrairement à la dopamine. Ainsi, elle entraîne moins de risque d'arythmie. L'utilisation de la dopamine comme protecteur rénal n'est pas recommandé.

3) Ventilation mécanique

Le système respiratoire est un des principaux systèmes touchés lors des défaillances d'organe liées au sepsis, et peut notamment entraîner un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Ainsi, le recours à la ventilation mécanique est souvent nécessaire. En revanche, ceci entraîne un risque accru pour le patient de développer des pneumopathies secondaires, acquises sous ventilation mécaniques (PAVM). Il est donc recommandé de minimiser la durée de sédation chez les patients pour diminuer la durée de ventilation mécanique et de permettre une mobilisation plus précoce. Les patients avec une ventilation mécanique doivent avoir la tête de leur lit positionnée à 30-45 degrés pour éviter les risques d'aspiration et prévenir le développement de pneumonie. Des essais quotidiens de respiration spontanée sont recommandés pour les patients prêts à être sevrés, afin de diminuer la durée de ventilation mécanique.

Pour les patients septiques présentant un SDRA, le volume courant cible est de 6 mL/kg par rapport au poids estimé du patient. La position en décubitus ventral est recommandée et le maintien d'un ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$. Pour les patients avec un SDRA sans preuve d'hypoperfusion tissulaire, une stratégie conservatrice en termes de perfusion est recommandée sous peine de participer à l'œdème pulmonaire. La ventilation oscillatoire haute fréquence et l'utilisation systématique de

cathéter de l'artère pulmonaire ne sont pas recommandées. Enfin, l'utilisation de β 2-agonistes pour les patients présentant un SDRA sans bronchospasme n'est pas recommandée.

4) Epuration extra-rénale

L'épuration extra-rénale est utilisée chez les patients développant une insuffisance rénale aigue au cours du sepsis. Ce traitement est primordial dans la prise en charge des patients septiques. En revanche, aucune recommandation sur le choix d'une méthode continue ou intermittente n'est donnée, les données de la littérature étant jugées insuffisantes.

5) Autres recommandations

Produits sanguins : L'administration de concentrés érythrocytaires est recommandée uniquement pour des concentrations d'hémoglobine < 70 g/L, sauf en cas de facteurs aggravants (infarctus du myocarde, hypoxie sévère, hémorragie aigüe). Il n'est pas recommandé d'administrer de l'érythropoïétine en cas d'anémie associée au sepsis.

Contrôle de la glycémie : Une approche protocolée de contrôle de la glycémie doit être utilisée pour les patients septiques. Une glycémie > 18 g/L doit entraîner l'administration d'insuline. La glycémie sera contrôlée toutes les 1 à 2 heures jusqu'à stabilisation de la glycémie puis toutes les 4h tant que l'insuline est perfusée. Les mesures de glycémie au lit du patient doivent être interprétées avec prudence car elles pourraient ne pas refléter précisément le taux de glucose artériel ou plasmatique.

Nutrition : Une nutrition entérale précoce doit être mise en place chez les patients septiques la tolérant. En revanche, la nutrition parentérale précoce seule ou en association avec une nutrition entérale n'est pas recommandée. Ainsi, en cas d'intolérance de la nutrition entérale dans les 7 premiers jours, une administration IV de glucose sera privilégiée. L'utilisation d'acides gras oméga-3 en tant que complément alimentaire pour renforcer le système immunitaire, de sélénium et de glutamine n'est pas recommandée.

Prophylaxie diverse : En l'absence de contre-indication, il est recommandé de mettre en place une prophylaxie de la thrombose veineuse profonde par l'administration d'héparine de bas poids moléculaire préférentiellement ou d'héparine non fractionnée. Il est également recommandé de mettre en place une prophylaxie des ulcères de stress en cas de facteurs de risque importants de saignement gastro-intestinal.

D'autres aspects de la prise en charge sont évoqués dans ces recommandations mais restent à explorer, les données publiées dans la littérature étant généralement insuffisantes pour permettre de donner des recommandations robustes. Ceci concerne notamment l'administration de corticoïdes

et d'immunoglobulines, ou encore l'utilisation de procédés d'hémodépuration. Ainsi, ces aspects de la prise en charge sont laissés pour l'instant à l'appréciation des cliniciens.

II. PHYSIOPATHOLOGIE

A. Réponse inflammatoire initiale

1) Profil de la réponse inflammatoire induite par le sepsis

L'hyperthermie, les défaillances d'organes et la détection de cytokines telles que l'IL-1 et le TNF- α dans le sang des patients septiques ont longtemps suggéré que le sepsis était dû à une réponse exclusivement pro-inflammatoire et incontrôlée face à un agent infectieux (**Fig.9A**). L'hypothèse d'un processus plus dynamique, initié par une phase inflammatoire caractérisée par le SIRS et faisant place dans un deuxième temps à un syndrome anti-inflammatoire compensatoire tardif a ensuite été évoquée, notamment devant le développement d'infections secondaires et de réactivations virales chez les patients, faisant évoquer une immunodépression sous-jacente (**Fig.9B**)⁴⁹. Finalement, la coexistence de marqueurs pro et anti-inflammatoires dans le sang de patients septiques a aboli l'idée d'un phénomène séquentiel et donné naissance au concept de « syndrome de réponse antagoniste mixte » (**Fig.9C**)⁵⁰. Dans ce scénario, la réponse pro-inflammatoire prédomine dans les premiers jours du sepsis comme le démontre les manifestations cliniques type défaillances d'organe, mais engendre la mise en place précoce de mécanismes compensateurs immunorégulateurs. Il a été émis l'hypothèse qu'une inflammation pouvait néanmoins persister et conduire, entre autres, à un hypercatabolisme, une malnutrition, une lymphopénie avec un déficit en T naïfs et une restriction du répertoire T. Ce phénomène alimente les mécanismes immunorégulateurs compensateurs menant à l'installation d'une immunodépression post-septique à long terme. Ce processus s'apparenterait à de l'immunosénescence accélérée⁵¹.

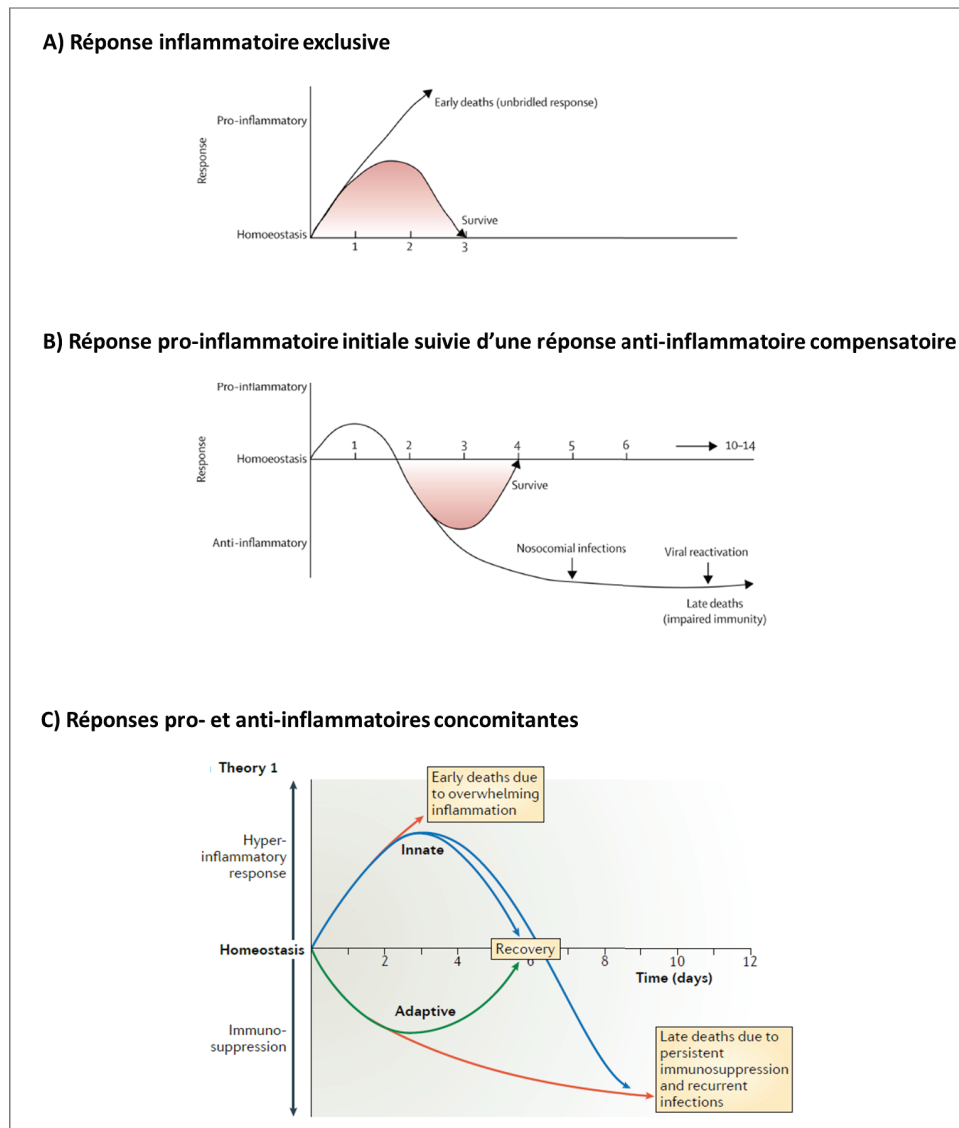


Figure 9. Hypothèses successives de la réponse inflammatoire développée au cours du sepsis ^{49,50}

2) Initiation de la réponse inflammatoire

Le sepsis est engendré par la reconnaissance simultanée de composants microbiens et de signaux de danger par le système du complément et par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) présents au niveau des cellules immunitaires, épithéliales et endothéliales. Plusieurs familles de PRR sont décrites en fonction de leur localisation cellulaire (**Fig.10A**). Les principales familles sont les récepteurs de type Toll (TLR), exprimés à la surface des cellules ou des vacuoles intracytoplasmiques ; les récepteurs intra et extracellulaires de type Lectine C (CLR); les récepteurs intracytoplasmiques de type « Nucleotide Oligomerization Domain Like Receptor » (NLR) et « Retinoic acid-Inducible gene-I » (RLR). Ces localisations différentes leur confèrent une spécificité relative à certains pathogènes et signaux de danger (**Fig.10B**) ⁵².

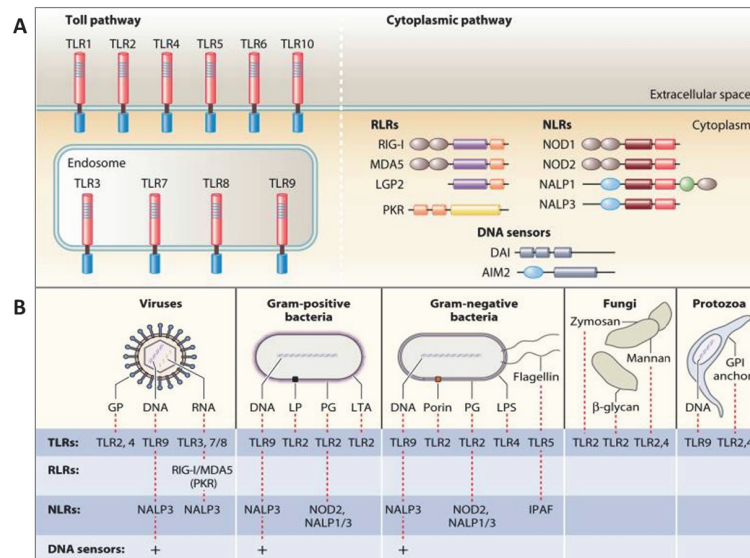


Figure 10. Localisation et spécificité des PRR ⁵²

La liaison du complément et de ces PRR avec des motifs associés aux microorganismes pathogènes (PAMPs) et à des composants du soi anormalement exposés lors de dommages tissulaires (DAMPs) induit une signalisation intracellulaire complexe (**Fig.11**). Celle-ci conduit à la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, l'immunité adaptative et le métabolisme cellulaire. La complémentarité de ces voies de signalisation explique que la réponse inflammatoire soit semblable qu'elle soit initiée par la reconnaissance d'une bactérie gram positif ou négatif, d'un champignon, d'un virus ou d'un traumatisme tissulaire. Un des principaux PAMPs impliqués dans la réponse inflammatoire du sepsis est le lipopolysaccharide (LPS), composant de la paroi des bactéries à Gram négatif, considéré comme une endotoxine pyrogène. Il est reconnu par le TLR4 de la membrane des cellules immunitaires.

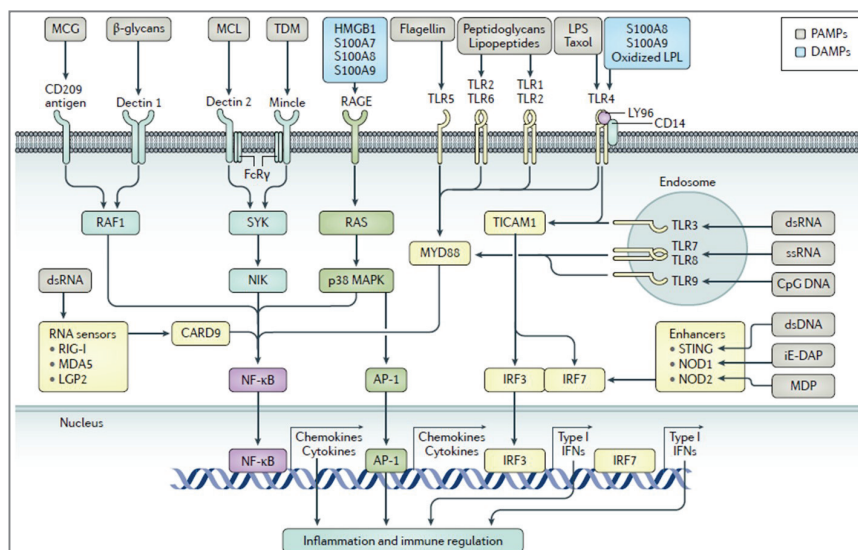


Figure 11. Récepteurs intra et extracellulaires responsables de la reconnaissance des composants microbiens et des signaux de danger ¹⁸

L'activation de NF- κ B induit la transcription de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, notamment par les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les macrophages tissulaires hyperactivés. La synthèse de grandes quantités de TNF- α , d'IL-1, d'IL-12, d'IL-18 et d'interférons (IFN) de type I initie une réponse cytokinique inappropriée appelée « orage cytokinique ». L'activation du complément et l'orage cytokinique transforment la réponse inflammatoire initialement bénéfique visant à éliminer le pathogène en une réponse excessive et délétère. Ses conséquences sont liées à l'activation de plusieurs systèmes : le système du complément, la cascade de coagulation, le système nerveux autonome, le système immunitaire adaptatif et l'apoptose (**Fig.12**).

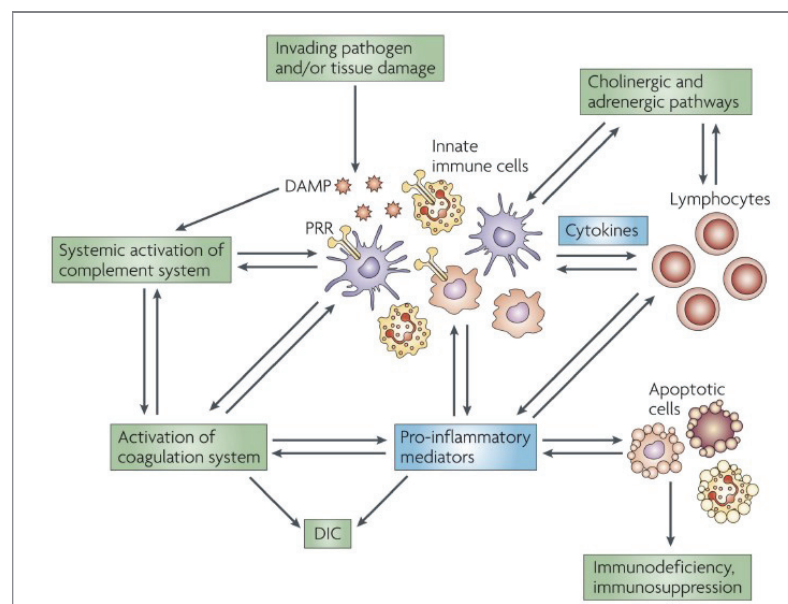


Figure 12. Réseau inflammatoire du sepsis ⁵³

3) Mécanismes effecteurs de la réponse inflammatoire

a) Activation du complément

L'activation du complément est au cœur de la physiopathologie du sepsis. Son activation par les PAMPs et les DAMPs mène à la synthèse des anaphylatoxines C3a, C4a et C5a, ainsi qu'à la formation du complexe d'attaque membranaire. Les concentrations élevées d'anaphylatoxines sont corrélées à de mauvaises issues cliniques dont une mortalité accrue ⁵⁴. C5a est particulièrement impliqué dans la réponse inflammatoire du sepsis. C'est un puissant chémoattractant des polynucléaires neutrophiles (PNN), monocytes et macrophages. Il provoque le burst oxydatif des PNN, et favorise ainsi le relargage d'espèces réactives de l'oxygène responsables d'importants dégâts tissulaires. Enfin, il stimule la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, amplifiant l'orage cytokinique décrit ci-dessus. C5a présente de nombreux effets néfastes au cours du sepsis de par son rôle dans l'exacerbation de la réponse inflammatoire, les dysfonctions d'organe, la dérégulation de la cascade de coagulation et l'apoptose des thymocytes et des cellules médullo-surréaliennes ^{18,53}.

b) Rupture de la barrière endothéliale

L'interface entre le sang et la paroi vasculaire est très interactive et régulée par l'endothélium. Ainsi, les cellules endothéliales préviennent l'activation des plaquettes et l'initiation de la cascade de coagulation en empêchant l'exposition du facteur tissulaire et des fibres de collagène au facteur VII et au facteur Willebrand. L'intégrité de l'endothélium est maintenue par le cytosquelette d'actine, le glycocalyx et les jonctions serrées présentes entre chaque cellule endothéliale. Dans le sepsis, ces structures sont perturbées par divers facteurs tels que la libération excessive de médiateurs inflammatoires et oxydants, l'expression accrue de sélectines et intégrines, l'adhésion des plaquettes et des PNN. La perte d'intégrité de la barrière endothéliale conduit à la fuite massive de protéines et liquide vasculaires vers les tissus, responsable de l'hypoperfusion tissulaire, l'hypotension artérielle et la défaillance cardiovasculaire caractéristiques du sepsis. Elle entraîne également l'initiation de la coagulation et l'extravasation des leucocytes au niveau tissulaire (**Fig.13**)¹⁸.

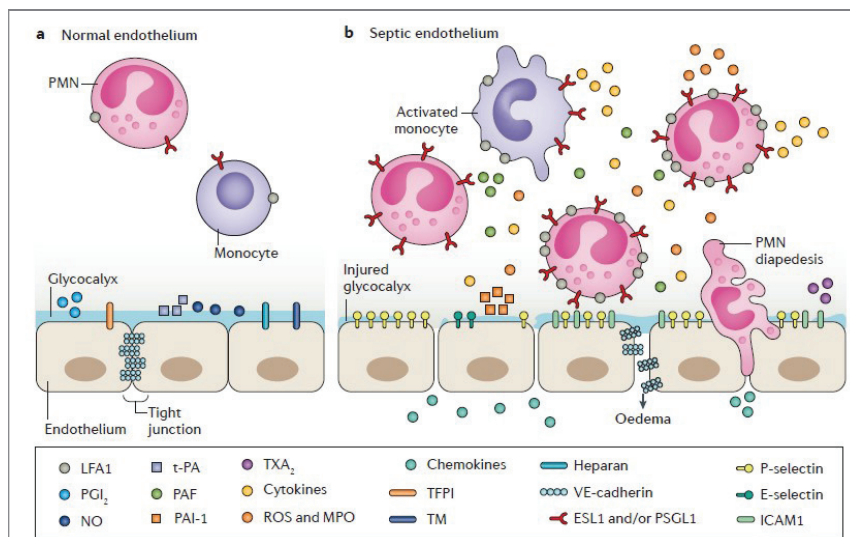


Figure 13. Modifications de la barrière endothéliale au cours du sepsis¹⁸

c) Activation de la cascade de coagulation

Suite à la rupture de la barrière endothéliale, le facteur tissulaire se retrouve exprimé par les cellules endothéliales lésées, le sous-endothélium anormalement exposé au flux sanguin ainsi que par les cellules immunitaires circulantes activées. En parallèle, le facteur Willebrand est activé par sa liaison au collagène de l'endothélium lésé. L'activation du facteur tissulaire et du facteur Willebrand initie la cascade de coagulation qui peut s'emballer et conduire à un état d'hypercoagulation, menant à l'une des complications majeures du sepsis : la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). En effet, les dépôts intravasculaires de fibrine entraînent des microthromboses au niveau de nombreux organes, engendrant une hypoperfusion et des ischémies. Ces anomalies amplifient les

dommages de l'endothélium causés par les microorganismes et l'inflammation et finalement conduisent au développement de défaillances multiviscérales. La CIVD est également associée à une inhibition de la fibrinolyse et une consommation des facteurs régulateurs de la coagulation, tels que l'antithrombine III, la protéine C, la thrombomoduline et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire. Au final, les phénomènes d'inflammation et de coagulation s'entretiennent. Le facteur XII est capable d'activer la voie classique du complément, et la thrombine peut agir comme une C5 convertase, permettant au C5a d'être généré en l'absence d'activation en amont (**Fig.14**). La thrombine activée favorise par ailleurs la production de cytokines proinflammatoires, qui ciblent et lèsent l'endothélium en retour. À terme, la CIVD engendre un phénomène d'hypocoagulation excessive, lié à la consommation des facteurs de coagulation et une dysfonction plaquettaire majeure, qui se traduit par des hémorragies.

Figure 14. Lien entre système du complément et coagulation ⁵³

Plus de 100 essais de phase I et II testant des stratégies pour modifier la réponse inflammatoire systémique ont été réalisés depuis 1976 ⁵⁵. Différentes stratégies ont été testées : anti-inflammatoires non spécifiques comme les corticoïdes ou les immunoglobulines polyvalentes, anti-inflammatoires spécifiques des médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α ou l'IL-1, anticoagulants ou encore composés ciblant les produits microbiens, *e.g.* endotoxines (**Tableau 3**). Le principal but de ces essais cliniques était de montrer une diminution du taux de mortalité chez les patients septiques traités. Les résultats n'ont montré qu'une efficacité très modeste des principales thérapeutiques testées.

Tableau 3. Essais cliniques visant la réponse inflammatoire du sepsis ¹⁸

Target	Class	Study type	Drug	Finding
Endocrine abnormalities	Corticosteroids	Meta-analysis	Corticosteroid	No or modest effect
	Vasopressors	Prospective RCT	Arginine vasopressin	No effect
Endotoxin	Monoclonal antibody	Prospective RCT	HA-1A E5	No effect No effect
	Lipid emulsion	Prospective RCT	GR270773	No effect
	Bactericidal-permeability increasing peptide	Prospective RCT	rBPI21	Modest effect
TLR4	Monoclonal antibody	Prospective RCT	TAK-242 Eritoran tetrasodium	No effect No effect
CD14	Monoclonal antibody	Prospective RCT	IC14	Unclear
TNF	Monoclonal antibody	Prospective RCT	BAY 1351	No effect No effect
	Immunoadhesin	Prospective RCT	Lenercept Etanercept	No effect No effect
IL-1	Receptor antagonist	Prospective RCT	Anakinra	No effect
PAF	PAF antagonist	Prospective RCT	TCV-309 Lexipafant	No effect No effect
Eicosanoids	NSAIDs	Prospective RCT	Ibuprofen	No effect
	Soluble phospholipase A2 inhibitor	Prospective RCT	Varespladib	No effect
C5a	Monoclonal antibody	Prospective RCT	CaCP29	Ongoing
Nitric oxide	L-N-methylarginine	Prospective RCT	546C88	Modest effect
	Reducing agents	Prospective RCT	Methylene blue	Modest effect
Hypercoagulability or disseminated intravascular coagulation	Activated protein C concentrate	Prospective RCT	Drotrecogin alfa (activated)	Beneficial No effect
	Tissue factor pathway inhibitor	Prospective RCT	Tifacogin	No effect
	Antithrombin	Prospective RCT	Antithrombin	No effect
	Anti-tissue factor antibody	Prospective RCT	ALT-836	No effect
	Heparin	Meta-analysis	Heparin salt	Modest effect
	Thrombomodulin	Prospective RCT	ART-123	Modest effect
Others	Intravenous immunoglobulin	Meta-analysis	Intravenous immunoglobulin	No effect
	Selenium (antioxidant)	Prospective RCT	Selenium	No effect
	Bradykinin antagonists	Prospective RCT	Deltibant	No effect
	N-acetylcysteine	Meta-analysis	N-acetylcysteine	No effect
	Statins	Meta-analysis	Atorvastatin, simvastatin and rovasastatin	No effect
	Extracorporeal haemoperfusion	Prospective RCT	Adsorber EN500	No effect

PAF, platelet-activating factor; RCT, randomized controlled trial; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumour necrosis factor.

Au fil des années, l'amélioration des connaissances de la physiopathologie du sepsis a montré qu'il est en fait peu probable d'obtenir un impact sur les issues cliniques du sepsis en bloquant un seul médiateur ou une unique voie de la réponse inflammatoire du sepsis. En effet, chez la souris septique, plus de 100 médiateurs sont impliqués dans la pathogénie de la réponse inflammatoire ⁵⁶, et l'administration de faible dose d'endotoxine chez l'homme altère l'expression de plus de 3000 gènes leucocytaires ⁵⁷. La deuxième cause majeure de l'échec de ces essais cliniques est l'absence de stratification des patients septiques en fonction de leur statut immunitaire. En effet, les patients de ces études constituaient des groupes hétérogènes d'individus, identifiés sur des critères seulement cliniques de SIRS associé à une infection, sans prendre en compte aucun marqueur spécifique qui pourrait prédire l'efficacité du traitement. Par exemple, il est improbable qu'une thérapeutique neutralisant une endotoxine montre une efficacité globale dans un groupe hétérogène de patients infectés par divers microorganismes, allant de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline au

virus Influenzae. De même, il a été montré que dans un groupe de patients présentant un sepsis sévère, les taux de TNF- α et IL-6 allaient de 7 à 57 000 et 8 à 1 550 000 pg/mL respectivement, suggérant que ces patients ne répondraient pas tous de la même façon aux éventuels traitements ciblant ces cytokines pro-inflammatoires ⁵⁸. Illustrant l'importance de la stratification des patients septique lors des essais cliniques, se, un essai de phase III portant sur l'Anakinra, un récepteur recombinant de l'IL-1, avait été abandonné car l'étude intermédiaire ne confirmait pas l'effet bénéfique sur la mortalité observé dans une précédente étude ^{59,60}. Or, une analyse rétrospective des données stratifiant les patients selon la présence d'une CIVD ou d'une défaillance hépatobiliaire a montré un effet bénéfique de l'Anakinra. Aucun effet n'était observé chez les autres patients ⁶¹. Enfin, l'échec de ces thérapeutiques anti-inflammatoires peut également être dû au traitement de patients ne présentant plus un état d'hyper-inflammation prédominant, mais au contraire chez lesquels une immunodépression s'était installée. Ce phénomène a été mis en évidence plus récemment et contribue à l'inefficacité de ces thérapeutiques ciblant l'infection et la réponse hyper-inflammatoire du sepsis.

B. Immunodépression induite par le sepsis

Malgré l'antibiothérapie maîtrisée et les mesures agressives de contrôle de la source infectieuse mises en place lors d'un diagnostic du sepsis, une étude post-mortem a montré qu'environ 80% des patients qui décèdent à la suite d'un sepsis présentent une infection non résolue ⁶². Par ailleurs, les patients survivants à la phase hyper-inflammatoire précoce développent fréquemment des infections nosocomiales à germes opportunistes faiblement virulents mais pathogènes chez les immunodéprimés, *e.g.* des infections fongiques, ainsi que des réactivations virales, notamment à virus de la famille *Herpesviridae* ^{21,63-65}. Ces observations suggèrent une défaillance immunitaire sous-jacente chez les patients septiques.

En 1977, Meakins *et al.* suggèrent une immunodépression chez les patients septiques à travers la perte d'hypersensibilité retardée lors de rappels avec des antigènes communs ⁶⁶. En 2011, sur des échantillons spléniques et pulmonaires de patients septiques décédés, Boomer *et al.* observent une diminution de sécrétion de cytokines, une augmentation d'expression du checkpoint immunitaire inhibiteur PD1 sur les lymphocytes, une diminution d'expression des molécules de costimulation sur les cellules présentatrices d'antigènes notamment HLA-DR et enfin, une expansion de populations régulatrices telles que les lymphocytes T régulateurs (Tregs) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) ⁶⁷. Ces résultats objectivent pour la première fois l'immunodépression induite par le sepsis, évoquée dans la littérature également sous le terme de « réponse compensatoire anti-inflammatoire » ou « reprogrammation cellulaire ». Ces altérations immunitaires ont des

mécanismes communs, touchent à la fois le système immunitaire innée et adaptatif ⁵⁰, apparaissent précocement après le début du sepsis et impliquent les cellules du sang périphériques mais également celles des organes, notamment lymphoïdes ⁶⁷. Enfin, leur durée et leur intensité sont associées à des risques accrus d'infections secondaires et de mortalité ⁶⁸. Ainsi, depuis quelques années les efforts de recherche se focalisent sur la caractérisation des altérations immunitaires induites par le sepsis et leurs mécanismes, principalement dans le but de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques du sepsis.

1) Mécanismes communs conduisant aux altérations immunitaires du sepsis

a) Apoptose cellulaire

Une déplétion importante des cellules immunitaires survient lors d'un sepsis, liée à un phénomène d'apoptose touchant les lymphocytes T, B et natural killer (NK), ainsi que les cellules dendritiques. Cette apoptose est décrite chez tous les patients septiques, adultes comme pédiatriques, quel que soit le pathogène impliqué ⁴⁹. Elle est observée au niveau du sang périphérique mais également dans les organes lymphoïdes. De nombreux stimuli différents sont impliqués dans l'activation de l'apoptose au cours du sepsis, activant aussi bien la voie extrinsèque du récepteur de mort cellulaire Fas que la voie intrinsèque mitochondriale. Une diminution d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est souvent observée au cours du sepsis, engendrant l'activation de la voie mitochondriale. L'effet délétère de l'apoptose du sepsis est lié à la déplétion sévère en cellules immunitaires, mais également à la prise en charge des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires résiduelles, ce qui engendre un mécanisme de tolérance immunitaire. Ce double effet entrave la lutte contre l'agent infectieux pathogène ⁶⁹⁻⁷².

Des anomalies au niveau d'autres formes de mort cellulaire programmée (pyroptose, nécroptose) et du phénomène d'autophagie ont également été observées au cours du sepsis et pourraient être impliqués dans la physiopathologie de l'immunodépression induite par le sepsis ⁷³.

b) Tolérance à l'endotoxine

Lors de l'exposition répétée au LPS, on assiste à une reprogrammation de la réponse inflammatoire engendrant une baisse de la production de cytokines inflammatoires lors d'un nouveau challenge infectieux. C'est le phénomène de tolérance à l'endotoxine, signature majeure de l'immunodépression induite par le sepsis. L'emblème de ce phénomène est un défaut de production de TNF α par les monocytes, associé à une altération de leur capacité de migration et de présentation antigénique illustrée par la perte d'expression du HLA-DR à leur surface (mHLA-DR), mais une augmentation de la phagocytose. Au niveau génomique, la reprogrammation se traduit par une diminution de la transcription des gènes de l'inflammation dits « tolérables », alors que celle

d'autres gènes dits « non-tolérables » est accrue, conduisant à la transcription préférentielle de molécules plutôt immunosuppressives comme l'IL-10⁷³.

c) Reprogrammation et altérations métaboliques

Une reprogrammation métabolique est également observée au cours du sepsis. Les monocytes surexpriment des gènes induits habituellement en cas d'hypoxie, comme celui d'HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α). HIF1 α induit l'expression d'IRAKM, une kinase associée au récepteur d'IL-1, qui entraîne la diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires, engageant les cellules vers un profil de tolérance. Associées à cette reprogrammation métabolique, le sepsis induit également des altérations du métabolisme cellulaire, qui inhibent leurs fonctions effectrices. Par exemple, les monocytes présentent un défaut de glycolyse, alors que c'est la voie de production d'ATP habituellement privilégiée lors de situations d'activation des leucocytes car elle est rapidement mobilisable. Au niveau des lymphocytes T, ces troubles métaboliques se traduisent par une altération de la voie mTOR, entraînant une incapacité à proliférer en réponse à un signal d'activation⁷³.

d) Régulation épigénétique

La régulation épigénétique joue un rôle important dans la reprogrammation transcriptionnelle observée au cours du sepsis. Elle implique à la fois des modifications post-traductionnelles des histones de la chromatine (méthylation, acétylation, ubiquitination, phosphorylation) et des méthylations de l'ADN. Ainsi, l'orage cytokinique induit par le sepsis entraînerait des modifications épigénétiques conduisant à des changements d'expression génique impliqués dans le phénomène de tolérance à l'endotoxine, l'apoptose et les modifications métaboliques décrites ci-dessus. Les modifications épigénétiques participent également aux altérations immunitaires post-septiques plus spécifiques. Par exemple, une augmentation de la méthylation de certaines histones des lymphocytes T CD4 est observée au niveau des gènes codant pour l'IFN γ des T auxiliaires (ou T « helper », Th) de type 1, mécanisme inhibant la transcription génique. Au contraire, une acétylation accrue d'une histone du promoteur de *Foxp3* apparaît après le sepsis, conduisant à une augmentation de la transcription de *Foxp3* caractéristique des Tregs. La persistance de l'immunodépression induite par le sepsis est probablement à relier à ces modulations épigénétiques, détectables longtemps après la résolution apparente du sepsis⁷³.

e) Régulation centrale par le système nerveux autonome

Le système immunitaire et le système nerveux communiquent pendant l'inflammation, à travers l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, le système nerveux autonome (SNA), la synthèse de neuromédiateurs et l'expression de leurs récepteurs directement par les cellules immunitaires..

Ce réseau de communication permet à l'organisme de s'adapter rapidement en cas de modifications de l'environnement interne et externe. Le sepsis est considéré comme une source de désordres neuro-endocriniens. En effet, le SNA participe initialement à l'inflammation de la réponse anti-infectieuse, notamment par l'intermédiaire du **SNA sympathique et du système nerveux entérique** qui induisent la production d'importantes quantités de **catécholamines**, libérées dans le sang et au niveau du foie. Les catécholamines se lient aux récepteurs α - et β -adrénergiques à la surface des cellules immunitaires et modifient leur fonctionnalité, *e.g.* translocation des lymphocytes de la rate vers les poumons et activation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, amplifiant ainsi l'orage cytokinique initial. Par ailleurs, les catécholamines pourraient stimuler la prolifération des bactéries au niveau du tractus gastro-intestinal, contribuant à la translocation bactérienne délétère. Néanmoins, la production endogène de catécholamines s'amenuise rapidement, à cause de l'apoptose des cellules médullaires surrénaliennes et de certaines populations leucocytaires sources de ces médiateurs. Ce déficit contribue alors aux défaillances cardio-vasculaires. En parallèle, l'activation de la branche **parasympathique** du SNA engendre la libération d'**acétylcholine**. Celle-ci active les récepteurs $\alpha 7$ -nicotiniques cholinergiques des macrophages et entraîne la diminution de leur synthèse de cytokines inflammatoires. Ce phénomène est dénommé « réflexe inflammatoire ». La branche splénique du nerf vague est particulièrement impliquée dans l'immunorégulation du sepsis car elle exerce un important contrôle de la production de TNF- α par la rate et des cellules immunitaires qui y transitent ⁵³. Une inflammation persistante de la microglie pourrait également contribuer à la pérennisation des mécanismes immunosuppresseurs à long terme. L'étude du rôle et des mécanismes immunorégulateurs du système nerveux dans l'immunodépression post-septique doit être approfondie mais est rendue difficile par l'utilisation de thérapeutiques agonistes de ces voies lors de la prise en charge des patients, *e.g.* Noradrénaline ⁷³.

2) Altérations immunitaires induites par le sepsis

Les mécanismes décrits ci-dessus sont responsables des altérations immunitaires menant à l'installation de l'immunodépression post-septique. Elles touchent l'ensemble des populations cellulaires du versant inné et adaptatif de la réponse immunitaire (**Fig.15**).

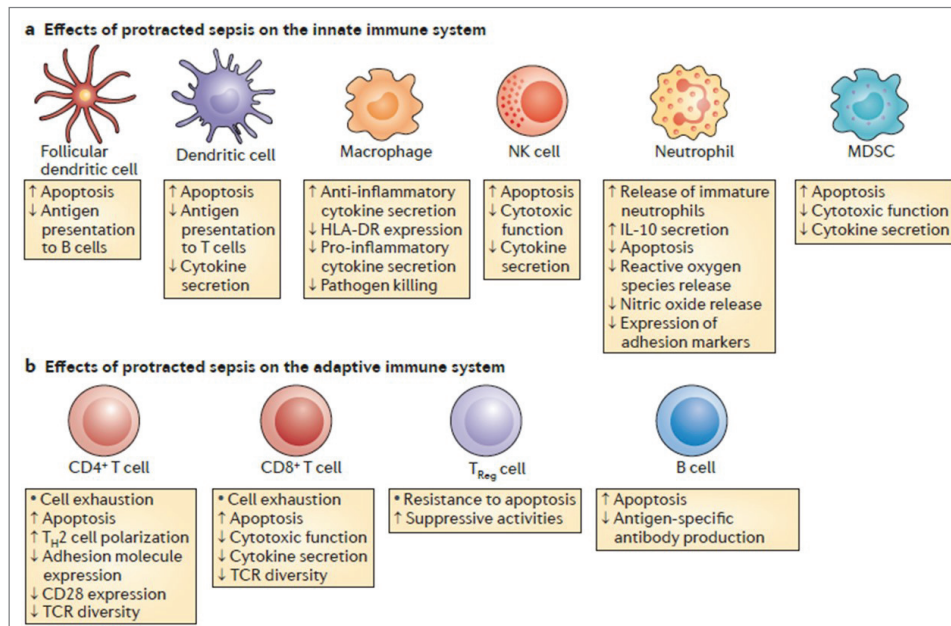


Figure 15. Altérations immunitaires post-septiques des principales populations leucocytaires ⁵⁰

a) Polynucléaires neutrophiles et MDSC

Les PNN sont sujets à l'apoptose au niveau périphérique mais de façon plus retardée que les lymphocytes ⁵⁰. En parallèle, de nombreux précurseurs immatures CD10^{lo}CD16^{lo} sont libérés de la moelle osseuse en réponse au sepsis ⁷⁴. Ces deux phénomènes entraînent une hyperleucocytose avec présence de PNN à différents stades de maturation au niveau du sang périphérique, caractéristique des patients septiques. Paradoxalement, les PNN présentent des altérations fonctionnelles, qui conduisent à un défaut d'élimination du pathogène. En effet, il est observé une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de lactoferrine, potentiellement liée à des anomalies des voies de signalisation des TLR ⁷⁵. Ces altérations ont probablement un rôle dans la perte d'efficacité des PNN de patients septiques à détruire les bactéries phagocytées ⁷⁶. Il est également décrit une perte de leur capacité de chimiotactisme empêchant leur recrutement au niveau des tissus infectés, liée à un défaut d'expression de CD11b, CXCR1 et CXCR2 et à l'action immunosuppressive du monoxyde d'azote ^{50,75}. En revanche, les fonctions de phagocytose et d'activation des PNN paraissent conservées ⁷⁵.

Au sein de cet important pool de PNN, certaines sous-populations présentant des propriétés immunosuppressives apparaissent. En effet, des PN immatures CD14⁺CD24⁺CD16^{lo} issus de patients septiques paraissent capables de tuer *ex vivo* les lymphocytes T activés en coculture ⁷⁴. Dans un modèle murin de sepsis, certains PNN prélevés au site d'infection sont capables de synthétiser d'importantes quantités d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire majeure ⁷⁷. Enfin, chez des volontaires sains ayant reçu de faibles doses d'endotoxines, des PNN CD16^{hi}CD62L^{lo} induits par IFN γ sont capables d'inhiber *ex vivo* la prolifération de lymphocytes T via l'expression de PD-L1, ligand de la

protéine Programmed cell death 1 (PD1)⁷⁸⁻⁸⁰. Ces observations évoquent la présence de cellules myéloïdes suppressives décrites en cancérologie, qui pourraient être aussi impliquées dans l'immunosuppression induite par le sepsis^{67,81,82}. Peu de données sur ces MDSC sont pour l'instant disponibles dans le sepsis, notamment du fait de la difficulté à définir un phénotype spécifique à ces cellules. Il a été récemment décrit chez les patients septiques une augmentation de la proportion de différentes populations de MDSC selon le type d'infection primaire, synthétisant des médiateurs immunosuppresseurs tels que l'IL-10, le TGF- β et des radicaux libres oxygénés, et capables d'inhiber *ex vivo* la prolifération des lymphocytes T et leur sécrétion d'IL-4 et d'IFN γ ^{83,84}.

b) Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) ont un rôle fondamentale dans la reconnaissance du pathogène, la présentation antigénique aux lymphocytes T, l'activation de la réponse immunitaire adaptative et la tolérance immunologiques aux antigènes du soi. Grimaldi *et al.* ont montré une déplétion importante des DC plasmacytoïdes (pDC) et conventionnelles (cDC) chez les patients présentant un choc septique⁸⁵. Riccardi *et al.* ont également observé une diminution des cDC chez des patients en sepsis sévère mais une augmentation de la sous-population de pDC. Dans les modèles pré-cliniques, une déplétion en DC dans la rate, le sang périphérique et la cavité péritonéale a été mise en évidence⁸⁶.

Au niveau phénotypique et fonctionnel, les DC résiduelles présentent une capacité diminuée de production de cytokines pro-inflammatoires mais synthétisent davantage d'IL-10 chez les patients septiques par rapport aux volontaires sains⁸⁷. Les DC ont une expression augmentée du facteur de transcription Blimp-1, impliqué dans le développement de fonctions tolérogènes⁸⁸. Elles ont une expression d'HLA-DR diminuée, suggérant une perte de leur fonction de présentation antigénique, participant au défaut de la réponse T^{85,87}. Dans des modèles murins, une perte de l'expression de molécules de costimulation tels que CD80, CD86 et CD40 est associée à une diminution de synthèse d'IL-12 par les DC, au profit d'une sécrétion d'IL-10 et de facteur de croissance transformant (TGF- β) immunorégulateurs. La synthèse de TGF- β entraîne une accumulation de Tregs dans les organes infectés⁸⁸. Le défaut d'IL-12 entraîne une diminution de l'activation des NK et de leur production d'IFN γ , impliqué dans la réponse antibactérienne⁸⁶. Ces observations orientent vers un shift des fonctions des DC vers un profil tolérogène et engendre une susceptibilité accrue aux infections secondaires⁸⁹.

c) Monocytes et macrophages

A cause du phénomène de tolérance à l'endotoxine, les monocytes issus de patients septiques sont incapables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1, IL-6 et

IL-12 en réponse à un stimulus par le LPS, des agonistes des TLR ou différents composants bactériens⁹⁰. Au contraire, la libération de médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 n'est pas altérée et même augmentée⁹¹. Les capacités de phagocytose et d'élimination intracellulaire du pathogène sont conservées. Les monocytes peuvent donc toujours être activés mais subissent une reprogrammation vers des voies immunorégulatrices^{92,93}. Cette reprogrammation conduit notamment à la diminution de présentation de l'antigène, illustrée par la perte d'expression du HLA-DR à la surface des monocytes et macrophages⁹⁴. La diminution du mHLA-DR est le marqueur emblématique de l'anergie monocytaire. Elle est corrélée aux altérations fonctionnelles des monocytes et macrophages, *e.g.* diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes et de la prolifération lymphocytaire liée au défaut de présentation antigénique^{68,94}. Les monocytes surexpriment par ailleurs PD-L1 et PD1, participant ainsi à l'épuisement des lymphocytes T observé lors du sepsis⁹⁵⁻⁹⁷. Enfin, des sous-populations de monocytes appartenant aux MDSC et présentant donc des propriétés immunosuppressives ont récemment été décrites au cours du sepsis⁹⁸.

d) Lymphocytes natural killer

Les lymphocytes NK sont à l'interface de l'immunité innée et adaptative, et jouent un rôle important dans la réponse immunitaire aux cancers, infections virales mais aussi bactériennes⁹⁹. De plus, il a récemment été découvert que les NK expriment plusieurs TLR et que, selon le microenvironnement cytokinique, ils sont capables de s'activer directement au contact des PAMPs et DAMPs sans contact avec d'autres cellules accessoires¹⁰⁰. Ces caractéristiques font des NK de potentiels acteurs de la physiopathologie du sepsis.

Chez les patients septiques, les lymphocytes NK sont sujets à l'apoptose induite par le sepsis et voient leur nombre diminuer précocement après le début du sepsis^{101,102}. Les deux principales populations de NK, CD56^{hi} et CD56^{lo}, sont touchées par cette déplétion¹⁰³. Les NK résiduels ont une expression de TLR2 et TLR4 augmentée, comme celle du marqueur d'activation CD69¹⁰⁴. Ils sont par ailleurs altérés au niveau fonctionnel comme le montre le défaut de cytotoxicité et de synthèse de cytokines, notamment d'IFN γ et de granzyme B^{97,102,105,106}. Chez la souris septique, la diminution de production d'IFN γ semble associée à l'expression d'un checkpoint inhibiteur, Tim-3¹⁰⁷. Les NK expriment également plus fortement PD1 et PD-L1 au cours du sepsis^{97,108}. Etant donné le rôle crucial des NK dans l'immunité antivirale, ces altérations pourraient contribuer aux réactivations virales fréquemment observées chez les patients au cours de la phase d'immunodépression post-septique.

e) Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ résident principalement au niveau des muqueuses, notamment intestinale, où ils peuvent reconnaître des motifs lipidiques ou protéiques phosphorylés microbiens, indépendamment de toute cellule présentatrice d'antigène. Ainsi, ils représentent une des premières lignes de défense contre certains pathogènes, en initiant une réponse immunitaire de type innée par la production de cytokines telles que l'IFN γ et l'IL-17. Chez les patients septiques, on observe une déplétion du nombre de lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le sang périphérique, dont l'intensité est associée à la sévérité du sepsis. Dans les modèles murins de sepsis, cette déplétion est également notée au niveau de la barrière épithéliale digestive, facilitant potentiellement la translocation bactérienne ^{27,109}.

f) Lymphocytes T CD4

Sous l'effet des cytokines produites par les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4 activés se différencient en cellules effectrices T auxiliaires ou « helper » (Th) dont on distingue quatre sous-populations principales Th1, Th2, Th17 et Tregs. Ces sous-populations présentent des spécificités distinctes en termes de facteurs de transcription caractéristiques, de cytokines sécrétées et de la nature de la réponse immunitaire orchestrée (**Fig.16**). Ainsi, un défaut en lymphocytes T CD4 a des répercussions importantes sur la fonctionnalité de nombreuses autres cellules immunitaires, induisant le développement d'une immunodépression acquise. Celle-ci engendre une susceptibilité accrue aux infections secondaires, notamment opportunistes, comme décrit dans la physiopathologie de l'infection à VIH.

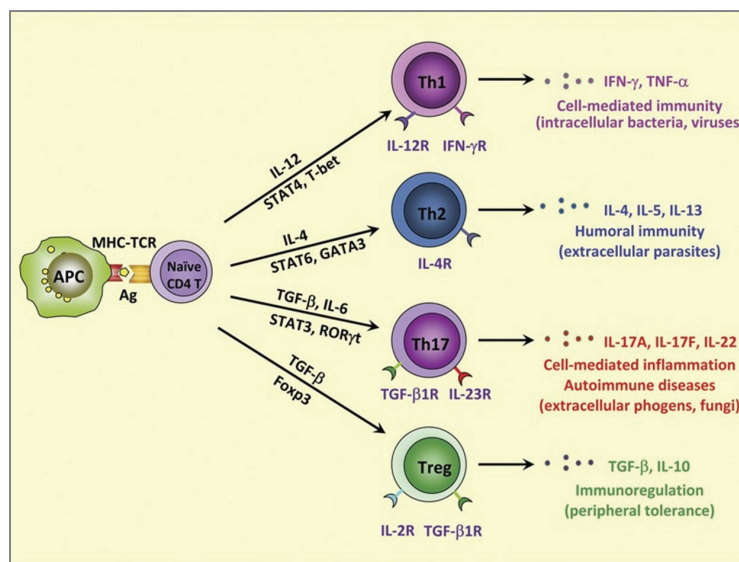


Figure 16. Caractéristiques des principales sous-populations lymphocytaires T CD4 (d'après ¹¹⁰)

Les cytokines sécrétées par les cellules présentatrices d'antigènes dirigeant le lymphocyte T CD4 activé vers l'une des voies de différenciation, ainsi que les facteurs de transcription caractéristiques exprimés sont représentés au niveau des premières flèches au milieu du schéma. Le rôle de chacune des sous-populations de lymphocytes T CD4 ainsi que leurs cytokines effectrices sont indiqués à droite du schéma.

Au cours du sepsis, les lymphocytes T CD4 sont touchés précocement par un important phénomène d'apoptose ⁵⁰. Les T CD4 résiduels présentent par ailleurs des défauts phénotypiques et fonctionnels importants. La production de cytokines par les Th1 et Th2 diminue, ainsi que l'expression de T-bet et GATA3. Des modifications épigénétiques type méthylation répressive des histones au niveau des régions promotrices des gènes IFNG et GATA3 semblent en partie responsables ¹¹¹. La réponse Th17, importante dans la protection contre les bactéries extracellulaires et les champignons, est également altérée au cours du sepsis, comme l'illustre la diminution d'expression du facteur de transcription ROR γ t. Une diminution de la capacité de prolifération des lymphocytes T est aussi constamment retrouvée ⁵⁰, ainsi qu'une restriction de la diversité du répertoire du TCR et des altérations des voies métaboliques de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative ⁷³. L'expression de plusieurs marqueurs d'activation à la surface des lymphocytes T CD4, tels que CD69 ou GLUT1, laissent penser que ces altérations pourraient résulter d'une hyperactivation initiale des lymphocytes T lors de la réponse inflammatoire initiale du sepsis, affectant leurs propriétés intrinsèques ⁷³. Par ailleurs, certaines de ces anomalies sont similaires à celles induites par le phénomène d'épuisement cellulaire (« exhaustion » en anglais), décrit habituellement dans des contextes d'exposition persistante à un antigène ou des signaux inflammatoires, tels que les infections virales chroniques ou les cancers. Dans ces contextes, l'épuisement des cellules T est associé à un contrôle inefficace de l'infection ou de la tumeur ¹¹². Dans le sepsis, ce phénomène a été initialement suggéré chez des patients décédés devant (i) un profond déficit de production d'IFN γ et TNF- α par les lymphocytes T stimulés *ex vivo* ; (ii) une diminution de l'expression du CD127, chaîne α du récepteur à l'IL-7, à la surface des lymphocytes T ; (iii) une augmentation de l'expression du checkpoint immunitaire inhibiteur PD1 sur les lymphocytes T CD4 et de son ligand PD-L1 sur les macrophages, les cellules endothéliales et épithéliales bronchiques ⁶⁷. L'activation de la voie PD-1/PD-L1 entraîne un déficit de prolifération, de production de cytokines et de cytotoxicité des lymphocytes T ^{96,113}. Depuis, une augmentation de l'expression d'autres checkpoints immunitaires inhibiteurs a été observée sur les lymphocytes T chez les patients septiques, notamment CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4), Tim-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator), et Lag-3 (Lymphocyte-activation gene-3) ⁷³. Enfin, les défauts touchant les autres cellules immunitaires au cours du sepsis et dont la coopération est nécessaire à la fonctionnalité des lymphocytes T (*e.g.* défaut de présentation antigénique par les cellules dendritiques et les monocytes) peuvent entraîner des anomalies lymphocytaires T.

En parallèle, au cours du sepsis on note que l'expression du facteur de transcription FOXP3 associé aux Tregs est conservée. De plus, chez les patients en choc septique la proportion de Tregs circulants est augmentée sans modification parallèle de leur valeur absolue, reflétant la déplétion

préférentielle des autres sous-populations de lymphocytes ¹¹⁴. La résistance des Tregs à l'apoptose serait liée à leur surexpression de Bcl-2, ainsi qu'aux signaux envoyés par certains DAMPs ou cytokines inductrices de Tregs ¹¹⁵. Notamment, l'IL-33 libérée en réponse aux dommages tissulaires sévères favorise l'expansion des Tregs par l'intermédiaire des macrophages M2 synthétisant de l'IL-10 ¹¹⁶. Les Tregs inhibent la prolifération et la fonction des T effecteurs mais régulent également la fonction de nombreuses cellules innées décrites précédemment, notamment en accentuant le phénomène de tolérance à l'endotoxine ¹¹⁷⁻¹¹⁹.

g) Lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD8 jouent un rôle essentiel dans le contrôle et l'élimination des pathogènes intracellulaires, par la production de molécules cytolytiques (*e.g.* granzyme B et perforine) et de cytokines type IFN γ et TNF- α . Ainsi, une altération du compartiment T CD8 peut compromettre sévèrement l'immunité de type cellulaire. Au cours du sepsis, les lymphocytes T CD8 sont touchés par les mêmes phénomènes d'apoptose que les lymphocytes T CD4 ⁵⁰. L'apoptose post-septique touche aussi bien les T CD8 précurseurs naïfs que les T CD8 mémoires spécifiques de l'antigène impliqués dans les réponses aux infections secondaires bactériennes ou virales. L'apoptose induit également une restriction du répertoire T CD8, fragilisant au long terme la réponse primaire à de nouveaux pathogènes. Les T CD8 résiduels entreprennent une prolifération clonale « homéostatique » afin de compenser la lymphopénie induite par le sepsis. Ceci n'est pas observé pour les lymphocytes T CD4. Cette prolifération homéostatique des T CD8 est indépendante des T CD4, expliquant le défaut de réponse protectrice T CD8 aux infections secondaires au sepsis. En effet, le défaut de coopération avec les T CD4 conduit à l'expression de TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) à la surface des T CD8, induisant l'apoptose des T CD8 lors d'une stimulation antigénique secondaire. Seuls les T CD8 polyclonaux ne nécessitant habituellement pas la coopération de T auxiliaires sont épargnés par ce phénomène et prolifèrent, contribuant à la restriction du répertoire T CD8 et son biais vers l'auto-réactivité ¹²⁰. La réponse des T CD8 est par ailleurs diminuée au cours du sepsis à cause des altérations des cellules présentatrices d'antigènes, dont la diminution d'expression d'HLA-DR et des molécules de costimulation freine l'activation des T CD8 ⁵⁰. Enfin, le sepsis entraîne un phénomène d'épuisement cellulaire des T CD8, dont le marqueur le plus décrit est l'augmentation de l'expression de PD1 ^{50,97}. L'épuisement cellulaire s'accompagne également d'une augmentation de CTLA-4, Lag-3 et CD244 à la surface des T CD8, d'un défaut de production d'IFN γ , de TNF- α , de granzyme B et d'un défaut de cytotoxicité illustré par la faible expression du CD107a ^{97,121-124}. L'épuisement cellulaire des T CD8 paraît moins prononcé que pour les T CD4, probablement du fait du rôle moins central des T CD8 dans la réponse immunitaire du sepsis

par rapport à celui qu'ils jouent dans les infections virales chroniques, où l'épuisement des T CD8 est majeur.

h) Lymphocytes B

Les lymphocytes B jouent un rôle primordial dans la réponse humorale en synthétisant les immunoglobulines. En tant que cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes B sont aussi capables de synthétiser différentes cytokines et d'activer les lymphocytes T. Enfin, certaines populations immunorégulatrices de lymphocytes B ont été décrites dans différents contextes cliniques. Les lymphocytes B sont ainsi capables d'orienter la réponse immunitaire. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées au rôle des lymphocytes B dans la physiopathologie de l'immunodépression du sepsis. La troisième partie de cette revue bibliographique focalisera sur les données disponibles sur cette population lymphocytaire.

i) Altérations immunitaires dans l'ensemble des organes lymphoïdes

Les altérations immunitaires décrites précédemment ne sont pas observées seulement dans le sang des patients septiques, mais elles touchent l'ensemble des organes lymphoïdes secondaires ainsi que certains sites infectés. En effet, l'apoptose cellulaire a été observée dans la rate et dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin lors de l'autopsie de patients décédés ⁶⁹, mais également dans la moelle osseuse et les poumons dans des modèles murins ¹²⁵. De même, les altérations phénotypiques (expression accrue des checkpoints inhibiteurs, diminution de l'expression du mHLA-DR) et fonctionnelles (diminution de la synthèse de cytokines proinflammatoires) sont retrouvées dans les poumons et la rate des patients ⁶⁷. La diminution de l'expression du mHLA-DR est observée au niveau de la moelle osseuse également ¹²⁶. Cette altération est cohérente avec le phénomène d'expansion des progéniteurs médullaires observée chez la souris au détriment des précurseurs plus différenciés ¹²⁷. Ce processus est initié afin d'alimenter le pool de leucocytes mobilisés en réponse à l'infection, mais pourrait finalement conduire à un défaut de maturation des progéniteurs et au développement des MDSC et des neutrophiles immatures décrits précédemment. L'ontogénie des lymphocytes T est également altérée au cours du sepsis à cause de l'inhibition de la différenciation des progéniteurs T médullaires et de l'atrophie thymique notamment ^{127,128}.

A travers ces résultats, on observe que l'ensemble des altérations immunitaires converge vers un déficit des réponses immunitaires effectrices mais un maintien ou une augmentation des fonctions régulatrices. Ce phénomène touche à la fois les organes lymphoïdes primaires, secondaires, pouvant ainsi être considéré à part entière comme une défaillance d'organe liée au sepsis.

3) Association des altérations immunitaires avec la mortalité et les infections nosocomiales

L'amélioration du diagnostic et de la prise en charge des patients septiques a permis de diminuer le nombre de patients décédant rapidement de la réponse inflammatoire massive observée dès le début du sepsis. Ainsi, 70% des décès surviennent après le 3^{ème} jour du sepsis. Ils sont principalement dus au développement d'infections secondaires favorisé par l'état d'immunodépression sous-jacente ²². L'immunosénescence accélérée des patients septiques se traduit par ailleurs par une mortalité accrue à long terme, dans les 10 ans suivant le sepsis, par rapport au reste de la population ¹²⁹. Ces graves conséquences cliniques sont associées à de nombreuses altérations immunitaires décrites dans le paragraphe précédent.

Premièrement, les défauts fonctionnels des **PN neutrophiles** décrits ci-dessus sont associés à un risque accru de développer des infections nosocomiales secondaires ⁷⁶ et de décès ⁷⁵. L'expression de PD-L1 à la surface des PNN circulants est par ailleurs corrélée à la baisse du mHLA-DR et prédictive de la sévérité du sepsis chez les patients ¹³⁰. La proportion de PN immatures CD10^{lo}CD16^{lo} est associée à la lymphopénie CD3 et CD4, ainsi qu'à la mortalité post-septique. Ainsi, Guerin *et al* décrivent un taux de survie avoisinant les 100% chez les patients dépourvus de cette population versus 63% chez ceux qui la présentent ⁷⁴. Par ailleurs, la proportion de **MDSC** circulantes mesurées précocement après le sepsis serait associée à un risque accru de développer des infections nosocomiales secondaires ^{83,98}. Ensuite, la déplétion en **cellules dendritiques** est plus importante chez les patients non-survivants ¹³¹ et ceux qui développent des infections secondaires ⁸⁵. L'expression de Blimp-1 par les DC est corrélée à la sévérité du sepsis ⁸⁸. L'intensité et la durée des altérations des **monocytes et macrophages** décrites dans la tolérance à l'endotoxine sont associées à la mortalité et au risque d'infections nosocomiales secondaires. Notamment, la diminution d'expression du mHLA-DR est un facteur prédictif indépendant de ces issues cliniques ^{132,133}. Enfin, au niveau des **altérations lymphocytaires**, une association entre le degré d'apoptose lymphocytaire et la sévérité du sepsis a été montrée chez les patients septiques ⁷². Dans les modèles précliniques, la prévention de l'apoptose lymphocytaire améliore la survie au cours du sepsis ¹³⁴. L'apoptose des lymphocytes présents dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses pourrait faciliter la translocation bactérienne, contribuant ainsi à l'entretien de la réponse inflammatoire et facilitant le développement d'infections secondaires ⁵⁰. La déplétion en **lymphocytes NK** dure plusieurs semaines et est associée à un plus fort taux de mortalité ¹⁰⁴. De par leur rôle majeur dans l'immunité antivirale, les altérations des NK induites après un sepsis pourraient favoriser les réactivations virales observées chez les patients septiques. De plus, la déplétion en NK produisant de l'IFN γ pourrait favoriser l'anergie monocytaire et ainsi le développement d'infections bactériennes secondaires ⁵⁰. La **lymphopénie T $\gamma\delta$** est plus importante chez les patients qui décèdent d'un sepsis que les individus y

survivant ²⁷. On peut également imaginer que la déplétion des lymphocytes T $\gamma\delta$ intraépithéliaux pourrait faciliter la translocation des pathogènes intestinaux vers la cavité péritonéale ou la circulation sanguine, aggravant ainsi le sepsis ou favorisant le développement d'infections secondaires ⁵⁰. Au niveau des **lymphocytes T CD4**, l'expression de PD1 est corrélée à un risque accru d'infections nosocomiales secondaires et de mortalité ⁹⁶. L'expression de BTLA paraît également associée à un risque accru de mortalité dans des études pré-cliniques ¹³⁵ et au développement d'infections secondaires chez les patients ¹³⁶. Des modèles murins de sepsis suggèrent par ailleurs que le défaut de réponse Th17 rend les patients plus sensibles aux infections secondaires à champignon ⁵⁰. De la même façon, l'expression de PD1 à la surface des **lymphocytes T CD8** est associée à un risque accru d'infections secondaires ¹²³, et celle à la surface des **lymphocytes T régulateurs** est inversement corrélée à la survie des patients septiques ¹³⁷. Enfin, certaines altérations immunitaires se reflètent **au niveau plasmatique**, et sont associées à un risque accru de mortalité. C'est le cas d'un taux d'IL-10 ou du ratio IL-10/TNF- α ¹³⁸, ou encore de la concentration de CD127 soluble (chaîne α du récepteur à l'IL-7) ¹³⁹. De la même manière, la mesure dans le sang total des transcripts du gène du CD127 trois jours après le diagnostic est indépendamment associée à la mortalité à 28 jours chez les patients en choc septique ¹⁴⁰.

Depuis quelques années, la description des altérations immunitaires induites par le sepsis a mis en évidence une perte des cellules effectrices de la réponse infectieuse au profit de la persistance de cellules immunorégulatrices. Ce phénomène se traduit cliniquement par un défaut de réponse aux antigènes de rappel, un risque accru d'infections secondaires et de réactivations virales, ainsi qu'une augmentation de la mortalité. L'association des altérations immunitaires et de leur traduction clinique a ainsi permis d'objectiver l'immunodépression profonde touchant les patients septiques. La levée de cette immunodépression représente désormais un des principaux enjeux du traitement du sepsis.

C. Traitement personnalisé du sepsis par thérapies immunostimulantes

Devant ces observations et après l'échec des essais cliniques de thérapies anti-inflammatoires, la nouvelle stratégie thérapeutique du sepsis vise chez certains patients à stimuler le système immunitaire par diverses immunothérapies ciblant les altérations spécifiques induites par le sepsis. C'est le principe de « l'immunostimulation ». Cette stratégie thérapeutique est actuellement employée en cancérologie. Son utilisation dans le contexte de sepsis prend son sens puisqu'il existe une importante similarité entre les altérations immunitaires décrites au cours du sepsis et celles décrites en cancérologie (**Fig.17**) ¹⁴¹. L'identification des patients développant une

immunodépresseion prolongée après le sepsis est un prérequis à l'emploi et au succès de telles thérapeutiques immunostimulatrices. Chez ces patients, l'immunothérapie devra (i) limiter l'immunosénescence accélérée et ses conséquences délétères et (ii) rétablir une réponse anti-infectieuse correcte, permettant l'éradication de la source primaire infectieuse et la prévention des infections nosocomiales secondaires létales.

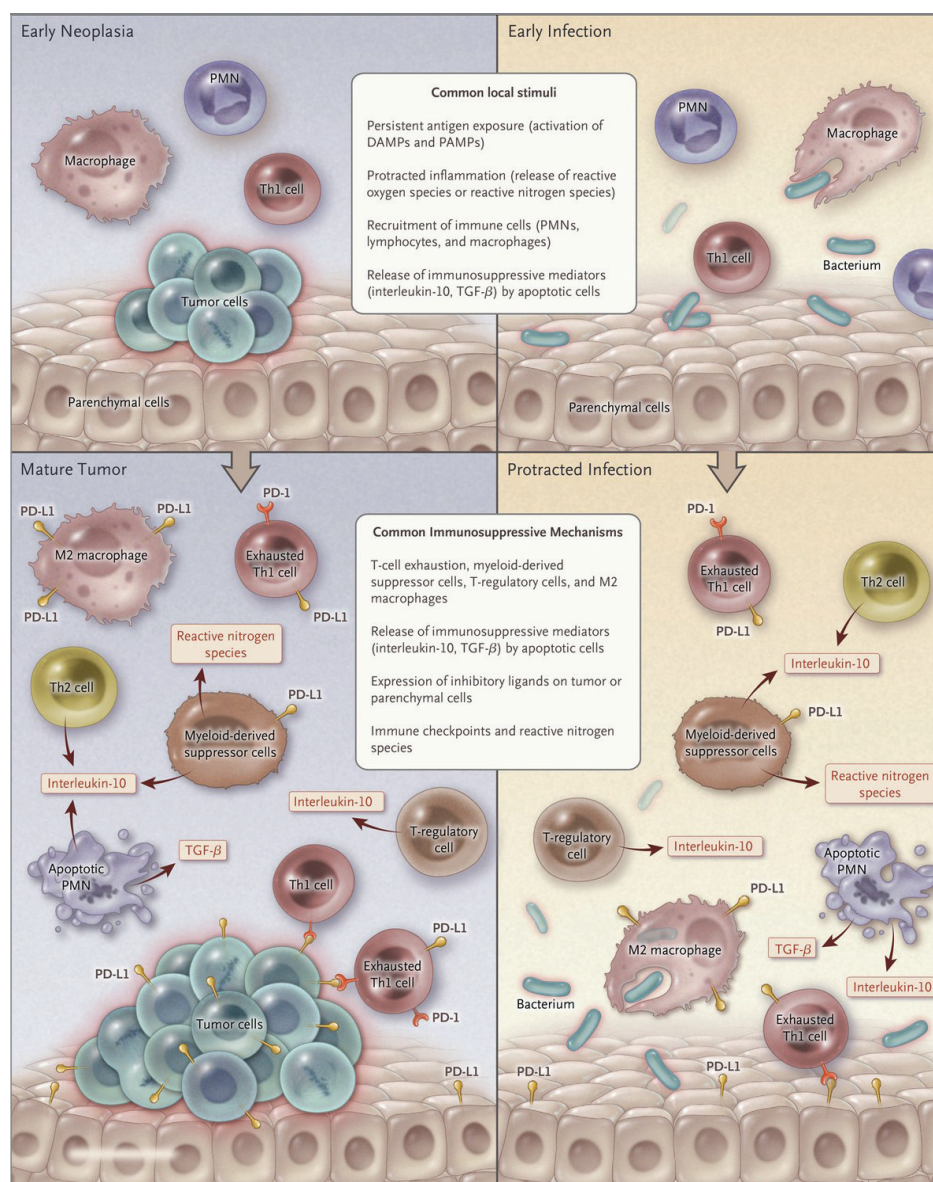


Figure 17. Réponse immunitaire dans les contextes de cancer et d'infection chronique ¹⁴¹

1) Immunothérapies envisagées

De nombreuses immunothérapies sont en cours d'investigation et montrent des résultats prometteurs lors de tests *ex vivo* ou dans des modèles pré-cliniques (**Tableau 4**), mais seules quatre d'entre elles font l'objet d'essais cliniques chez les patients septiques^{18,73,142}.

Tableau 4. Liste non-exhaustive de molécules candidates à l'immunothérapie du sepsis ¹⁸

Agent	Function	Findings
GM-CSF	- Increases myelopoiesis - Activates monocytic or macrophage population-producing inflammatory cytokines and adhesion molecules - Increases HLA-DR expression on antigen-presenting cells - Increases neutrophil phagocytosis and killing in combination with IFNγ	- Decreased the number of patient ICU days - Decreased the APACHE II score[*] - Trend towards improved survival
G-CSF	- Increases myelopoiesis - Increases neutrophilia	Failed to improve outcome
IFN γ	- Increases monocyte expression of inflammatory cytokines - Increases HLA-DR expression and antigen presentation - Increases macrophage and neutrophil bactericidal activity	- Reversed immunoparalysis - Decreased mechanical ventilation time
IL-7	- Induces T cell survival and proliferation - Protects from apoptosis - Recovers from 'T cell exhaustion' - Increases T cell activation and adhesion molecule expression - Increases IL-17-dependent neutrophil recruitment	- Well tolerated - Reversed key immunological defects in patients with sepsis
IL-15	- Improves the development, function and homeostasis of memory CD8⁺ T cells, NK cells, NKT cells and intestinal epithelial cells - Induces the rapid proliferation of memory and naive CD8⁺ T cells and CD4⁺ T cells - Increases the production of pro-inflammatory cytokines when combined with IL-12 - Increases dendritic cell activation	- Still in phase I trials - Preclinical trials have shown proliferation of NK cells, T cells and B cells, and resistance to T_{reg} cell suppression - Some dose-limiting toxicity at 3 mg per kg of body weight
Thymosin- α 1	- Increases CD4⁺ T cell and NK cell numbers - Augments T cell function - Increases HLA-DR expression on antigen-presenting cells - Enhances antiviral activity	Trend towards improved survival
PDL1-specific antibody	- Releases checkpoint inhibition - Prevents T cell exhaustion or T cell anergy - Reduces T cell apoptosis - Modulates myeloid cell interactions with the endothelium - Potentially alters macrophage and neutrophil antimicrobial functions	- Improved survival in animal models of sepsis - Breakthrough status in several malignancies, including melanoma, squamous cell carcinoma, non-small-cell lung cancer and renal cell carcinoma
CTLA4-specific antibody	- Suppresses T_{reg} cell expansion - Reduces T cell apoptosis - Releases checkpoint inhibition - Prevents T cell exhaustion or T cell anergy	CTLA4-specific antibodies improved outcome to polymicrobial and fungal sepsis in rodent models
TIM3-specific antibody	- Upregulates CD80 and CD86 expression on macrophages - Downregulates inflammatory cytokine production - Polarizes T cells towards a T_H1 response - Blocks lymphocyte apoptosis	TIM3 overexpression reduced the severity of rodent sepsis, whereas blocking TIM3 exacerbated inflammation
LAG3-specific antibody	- Prevents T cell exhaustion - Promotes T_{reg} cell expansion - Increases plasma dendritic cell activation	- LAG3 cell-surface expression is increased in sepsis - Has not been tested in rodent models of sepsis

CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HLA-DR, human leukocyte antigen-antigen D related; ICU, intensive care unit; IFN γ , interferon- γ ; LAG3, lymphocyte activating gene 3; NK cell, natural killer cell; NKT cell, natural killer T cell; PDL1, programmed death ligand 1; TH1, T helper 1; TIM3, T cell immunoglobulin and mucin-containing protein 3; Treg cell, regulatory T cell. ^{*}Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score is a severity-of-disease classification system.

a) L'interleukine 7

L'IL-7 a de multiples rôles dans la physiologie du système immunitaire, elle est notamment indispensable au développement des lymphocytes B et T dans la moelle osseuse. Elle est synthétisée par les cellules stromales de plusieurs organes dont la moelle osseuse, le thymus et les organes lymphoïdes secondaires. L'IL-7 interagit avec les lymphocytes via son récepteur composé des chaînes CD127 et CD132. Au niveau des lymphocytes T, ce récepteur est exprimé plus fortement sur les T naïfs et mémoires centraux que sur les Tregs. L'IL-7 induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 nécessaire à la survie des lymphocytes T, entraîne la prolifération des T CD4 et CD8 tout en diminuant la proportion de Tregs circulants, élargit la diversité du répertoire T, augmente l'expression de molécules d'adhésion améliorant l'accès des lymphocytes T aux sites d'infection et stimule les T épuisés en diminuant leur expression de PD1 ¹⁴³. Une forme recombinante de l'IL-7, « CYT107 », a fait l'objet d'essais cliniques en cancérologie ¹⁴⁴, dans la leucoencéphalopathie multifocale progressive à JC virus ¹⁴⁵, dans les infections à VIH ¹⁴⁶ et chez des patients greffés de moelle osseuse ¹⁴⁷. Elle présente un bon profil de tolérance, avec peu de fièvre, peu de syndrome de fuite capillaire et autres effets indésirables habituellement décrits lors de l'emploi de cytokine-médicaments.

Dans le sepsis, le traitement *ex vivo* de lymphocytes T issus de patients en choc septique par de l'IL-7 restaure les altérations lymphocytaires T décrites précédemment, *e.g.* les défauts de prolifération, de production d'IFN γ , d'expression de Bcl-2 ^{148,149}. Par ailleurs, plusieurs études sur des modèles murins de sepsis ont montré l'effet bénéfique du traitement par IL-7 sur la fonctionnalité des lymphocytes T mais également sur la survie des animaux traités ¹⁵⁰⁻¹⁵². A la suite de ces données expérimentales encourageantes, le premier essai clinique d'IL-7 chez des patients en choc septique (n=17) a récemment vu le jour. L'IL-7 a été administrée deux fois la première semaine suivant le choc septique, puis une ou deux fois par semaine selon le sous-groupe de patients, pendant un total de 4 semaines ou jusqu'à sortie du service de réanimation. Un groupe recevant un placebo a été inclus en parallèle dans l'étude (n=10). Les résultats sont très prometteurs puisque l'IL-7 a été bien tolérée et a montré un effet sur la lymphopénie, en entraînant une hausse de 3 à 4 fois le nombre de lymphocytes totaux, T CD4 et T CD8 circulants (**Fig.18**) ¹⁵³.

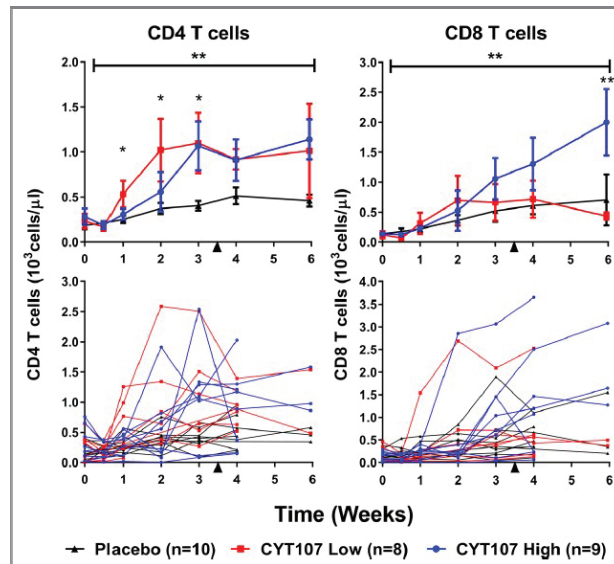


Figure 18. Effet du traitement par IL-7 sur la numération des lymphocytes T CD4 et CD8 chez des patients en choc septique ¹⁵³

CYT107 Low correspond au groupe de patients recevant la protéine CYT107 une fois par semaine et CYT107 High à celui traité deux fois par semaine par CYT107. Les données sont présentées en moyenne +/- écart-type (graphiques du haut) ou pour chaque individu (graphiques du bas).

b) Les anticorps anti-PD1 et anti-PD-L1

Le blocage des checkpoints immunitaires inhibiteurs est une des thérapies les plus prometteuses. En effet, en cancérologie, plusieurs anticorps monoclonaux se sont vus récemment attribués une autorisation de mise sur le marché en France. Le pembrolizumab et le nivolumab sont des anti-PD1, utilisés dans le traitement du mélanome, du cancer bronchique non à petites cellules et du lymphome de hodgkin principalement. L'ipilimumab est dirigé contre CTLA-4 et utilisé dans certains cas de mélanomes. Les altérations liées à l'épuisement cellulaire observées dans le sepsis et en cancérologie étant très similaires, il est fort probable que ces immunothérapies engendrent un effet bénéfique dans le traitement de l'immunodépression induite par le sepsis. Plusieurs modèles précliniques de sepsis ont confirmé l'intérêt de cibler ces molécules inhibitrices, notamment l'axe PD1/PD-L1, qui engendre la restauration des fonctions des cellules immunitaires innées et adaptatives et améliore la survie ¹⁵⁴. Aux USA, un essai clinique de phase I évaluant la tolérance et la pharmacocinétique du Nivolumab chez les patients en sepsis sévère ou choc septique est terminé depuis janvier 2018 et les résultats sont en cours d'analyse (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02960854). Un essai clinique de phase I évaluant le profil de sécurité d'un anticorps anti-PD-L1 chez des patients en choc septique a été interrompu récemment pour modification des priorités de l'industrie pharmaceutique commercialisant cette molécule (ClinicalTrials.gov Identifier NCT02576457).

c) L'interféron γ

L'IFN γ est un puissant stimulant des monocytes et macrophages mais sa production est fortement altérée lors du sepsis. Une petite étude clinique a montré que le traitement par IFN γ de patients septiques présentant un mHLA-DR diminué et une production réduite de TNF- α après stimulation LPS permet de restaurer la fonction des monocytes et a priori améliorer la survie des patients ¹⁵⁵. Par ailleurs, l'effet du traitement par IFN γ a depuis été décrit ponctuellement dans un cas clinique de sepsis réfractaires à *Staphylococcus* ¹⁵⁶ et dans une étude sur des infections sévères à *Candida* ou *Aspergillus* ¹⁵⁷. Un essai clinique a testé chez 18 volontaires sains recevant des injections de LPS à faible dose l'effet de l'administration d'IFN γ sur le développement de l'immunodépression post-septique. Par rapport au placebo, le traitement par IFN γ limite la diminution du mHLA-DR, l'augmentation des taux d'IL-10 et la diminution de TNF- α plasmatiques liées à l'injection de LPS ¹⁵⁸. Suite à ces résultats, une nouvelle étude clinique de phase III a été mise en place, consistant à traiter des patients en choc septique lors de la phase d'immunodépression par de l'IFN γ ou un placebo. Dans cette étude, le moment d'administration de l'IFN γ est déterminé par la réduction de 50% de la dose de noradrénaline maximum administrée au début de l'épisode septique, marquant la fin de la période pro-inflammatoire du sepsis et la prédominance de la phase d'immunodépression (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01649921). Une autre étude clinique testant les effets de l'IFN γ , en parallèle de ceux de l'Anakinra inhibiteur de l'IL-1 β , est en cours. Les patients sont dirigés dans l'un ou l'autre des bras de l'étude selon un panel de biomarqueurs caractéristiques de leur statut immunitaire, non détaillé pour l'instant (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03332225).

d) Les facteurs de croissance granulocytaires

Comme les lymphocytes T et les monocytes, les polynucléaires neutrophiles sont profondément altérés lors du sepsis. L'utilisation du facteur de croissance granulocytaire (G-CSF) a été évaluée dans plusieurs études chez des patients hospitalisés pour des infections pulmonaires graves. Le G-CSF augmente le nombre de PNN, mais n'a aucun impact sur la survie des patients septiques ^{159,160}. Ces résultats vont dans le sens de la physiopathologie du sepsis, où la moelle osseuse produit en grande quantité des PNN mais dont la fonction est altérée ou tournée vers un état immunorégulateur.

D'autres études se penchent néanmoins sur l'intérêt potentiel du facteur de croissance granulocytaire et macrophagique (GM-CSF) dans le traitement du sepsis. En effet, le GM-CSF agit au niveau des PNN mais également des monocytes et macrophages. Une première étude clinique sur des volontaires sains recevant du LPS à faible dose a testé l'effet de l'administration de GM-CSF sur le développement de l'immunodépression post-septique. Par rapport au groupe d'individus traités par placebo, l'administration semble empêcher le développement d'altérations telles que la baisse du

mHLA-DR, ou l'élévation des concentrations plasmatiques d'IL-10 ¹⁵⁸. Par ailleurs, deux essais cliniques ont testés l'administration de GM-CSF lors de la phase d'immunodépression du sepsis, en stratifiant les patients septiques en fonction de l'expression du mHLA-DR ¹⁶¹ ou de la production de TNF- α après stimulation de sang total par LPS ¹⁶². Le traitement par GM-CSF entraîne la restauration de l'expression du mHLA-DR et de la production de TNF- α , la diminution de la durée de ventilation mécanique, de séjour en réanimation et d'hospitalisation, ainsi que le développement d'infections nosocomiales secondaires. Une étude clinique de plus grande envergure vient de se terminer à Lyon. L'étude « GRID » vise à évaluer l'effet du traitement par GM-CSF sur le développement d'infections secondaires chez des patients en sepsis sévère ou choc septique. Les patients étaient sélectionnés sur une valeur de mHLA-DR inférieure à 8000 AB/C (antibody bound per cell), signant l'immunodépression post-septique (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02361528).

2) Biomarqueurs de l'immunodépression induite par le sepsis

Un des principaux challenges de l'immunothérapie est d'arriver à booster la réponse immunitaire sans causer des effets indésirables liés à une réponse exagérée du système immunitaire. En effet, lors de l'utilisation dans des contextes de cancers de certaines immunothérapies, il a été décrit quelques cas de complications auto-immunes graves ¹⁶³. De plus, l'instauration d'une immunothérapie chez un patient présentant une réponse inflammatoire prédominante après le sepsis pourrait empirer les dysfonctions d'organe et la gravité du sepsis. Cette préoccupation est d'autant plus pertinente que les patients septiques présentent une hétérogénéité importante en termes de profils et de trajectoires immunitaires. Ainsi, l'utilisation de biomarqueurs est fondamentale pour identifier (i) le candidat idéal, (ii) le moment d'administration idéal, (iii) la molécule idéale ciblant les altérations immunitaires observées chez le patient, (iv) le suivi de l'efficacité des immunothérapies. Ceci est essentiel pour espérer une réussite de la stratégie d'immunostimulation comme thérapeutique spécifique du sepsis. Les potentiels biomarqueurs biologiques traduisant l'immunodépression induite par le sepsis sont récapitulés dans le **tableau 5**.

Tableau 5. Biomarqueurs biologiques de l'immunodépression induite par le sepsis ^{50,73,142}

	Biomarqueur	Faisabilité	Indication
Immunité innée	↘ HLA-DR sur les monocytes circulants	+++	• Diagnostic et suivi de l'immunodépression • Instauration du GM-CSF, IFNγ
	↘ production de TNF-α par les cellules du sang stimulées par LPS	++	• Diagnostic et suivi de l'immunodépression
	↗ expression PD-L1 sur les monocytes circulants	+++	• Instauration des anti-PD1 et anti-PD-L1
	↗ taux IL-10 plasmatique	++	• GM-CSF, IFNγ
	Signature génomique ou transcriptomique	+	• Diagnostic de l'immunodépression
Immunité adaptative	Lymphopénie totale	++++	• Diagnostic et suivi de l'immunodépression • Instauration d'IL-7
	↗ expression PD1 et BTLA sur les T CD4 ou CD8 circulants	+++	• Instauration des anti-PD1 et anti-PD-L1
	↗ nombre de Tregs circulants	+++	• Instauration d'IL-7
	Expression du CD127 sur les lymphocytes T*	+++	• Instauration d'IL-7
	↘ production d'IFN γ par les lymphocytes T après stimulation <i>ex vivo</i>	++	• Diagnostic et suivi de l'immunodépression
	↘ prolifération des lymphocytes T après stimulation <i>ex vivo</i>	++	• Diagnostic et suivi de l'immunodépression
	Signature génomique ou transcriptomique	+	• Diagnostic de l'immunodépression

Les tests fonctionnels sont les méthodes de référence (en gras dans le **tableau 5**), puisqu'ils permettent de mesurer directement la capacité des cellules à répondre aux pathogènes. Néanmoins, ces tests sont difficilement réalisables : ils sont généralement réalisés dans un laboratoire spécialisé non ouvert 24h/24 ni 7J/7, nécessitent du personnel qualifié et requièrent plusieurs étapes de purification et stimulation généralement longues, avec un résultat finalement disponible seulement au bout de plusieurs jours. Des améliorations techniques ont néanmoins été apportées ces dernières années à ces tests, avec la possibilité par exemple de réaliser le dosage en sang total de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux sur monocytes ou lymphocytes stimulés en seulement quelques heures (**Annexes 6 et 8**), ou grâce à la commercialisation de cytomètres de flux miniaturisés et automatisés, quasiment utilisables au lit du patient (**Annexe 7**).

Pour pallier à ces inconvénients, des marqueurs phénotypiques ou plasmatiques peuvent être utilisés. En particulier, le marqueur de référence pour l'évaluation de l'état d'immunodépression du versant inné de l'immunité est le mHLA-DR. En effet, la diminution d'expression du HLA-DR à la surface des monocytes est prédictive de complications dans diverses situations cliniques (*e.g.* cirrhose, brûlures sévères, traumatismes majeurs, ...). Notamment, sa persistance est associée au développement d'infections nosocomiales dans le sepsis ¹³². Sa mesure est standardisée et utilisable en pratique clinique de routine ¹⁶⁴. De plus, dans certaines études cliniques stratifiant les patients candidats sur la valeur du mHLA-DR, l'administration de thérapeutiques immunostimulantes engendrent une augmentation du mHLA-DR associée à la restauration de la production de TNF- α ^{155,161}. Il n'existe pour l'instant pas de tel marqueur pour le versant adaptatif de la réponse immunitaire.

Enfin, les analyses multidimensionnelles sont encore à leurs balbutiements dans la caractérisation du sepsis, mais pourraient identifier des signatures immunitaires complexes

permettant de distinguer les patients à risque de développer un sepsis, mais permettant aussi de prédire le pronostic des patients septiques et leur réponse au traitement. Ceci est le cas des méthodes « -omiques » , dont le potentiel est illustré dans une méta-analyse récente d'études transcriptomiques comprenant au total 949 patients en sepsis et proposant un modèle physiopathologique de la réponse génomique au sepsis ¹⁶⁵. Dans le même sens, des technologies d'analyse multidimensionnelle du phénotype des cellules immunitaires voient le jour, telles que la cytométrie de masse, et pourraient fournir des outils très efficace pour caractériser les altérations immunitaires induites par le sepsis et révéler d'éventuelles signatures phénotypiques associées aux issues cliniques, comme montré dans un contexte de trauma ¹⁶⁶.

L'identification d'un marqueur idéal et universel est peu probable, et l'utilisation d'une association de plusieurs marqueurs caractéristiques du phénotype, de la fonctionnalité et du génome/transcriptome des cellules immunitaires du patient sera sûrement la meilleure méthode pour identifier les patients immunodéprimés et suivre leur évolution sous immunothérapie.

III. FOCUS SUR LES LYMPHOCYTES B

A. Physiologie des lymphocytes B

1) *Présentation des sous-populations lymphocytaires B*

Au sein des lymphocytes B, deux populations venant de lignées distinctes sont décrites et dénommées « B-1 » et « B-2 ». Les lymphocytes B-2 regroupent les B folliculaires et les B de la zone marginale (MZ-B). Les B-1 et les MZ-B constituent ce qu'on appelle les B « non conventionnels » alors que les B folliculaires sont les B « conventionnels ». Ces populations présentent différentes caractéristiques décrites dans les paragraphes ci-dessous et résumées dans le **tableau 6**.

a) *Les lymphocytes B-1*

Les lymphocytes B-1 ont été décrits principalement chez la souris. Ils sont présents au niveau des cavités péritonéale et pleurale. Le CD5 a longtemps été le marqueur de référence pour identifier les B-1, néanmoins, certaines cellules B-1 sont dépourvues de ce marqueur. Ceci a conduit à distinguer deux sous-populations **B-1a** et **B-1b**, l'expression du CD5 caractérisant les lymphocytes B-1a. Les phénotypes communément utilisés pour caractériser ces populations chez la souris sont respectivement $CD5^+CD11b^+CD45RA^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}CD23^-CD43^+$ et $CD5^-CD45RA^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}CD23^-CD43^+$. Chez l'homme, l'existence des B-1 a longtemps été controversée, notamment du fait de la difficulté à les identifier phénotypiquement. En effet, l'expression du CD5 est retrouvée sur les B naïfs transitionnels et sur des lymphocytes B-2 conventionnels dans certaines situations d'activation. Néanmoins, un phénotype consensuel a pu être mis en évidence ces dernières années, définissant les cellules B-1 chez l'homme comme $CD20^+CD27^+CD38^{lo/int}CD43^+$. Elles diffèrent des cellules B-2 activées par leur manque d'expression de CD69 et CD70. Environ 70% des B-1 humains expriment le CD5. Les B-1 sont décrites principalement dans le sang des adultes et du cordon ombilical. Une localisation préférentielle, comme les cavités péritonéales et pleurales chez la souris, est aujourd'hui inconnue chez l'homme ¹⁶⁷. Comme chez la souris, les plasmablastes issus des B-1 synthétisent spontanément des IgM polyréactives « naturelles », reconnaissant des signatures moléculaires partagées par des antigènes microbiens notamment de la flore commensale, et des autoantigènes. Ainsi, les B-1 ont un rôle principalement dans la réponse innée anti-infectieuse et dans les fonctions d'homéostasie d'élimination des débris cellulaires apoptotiques. Ils peuvent par ailleurs engendrer des réponses thymo-indépendantes spécifiques de l'antigène.

b) Les lymphocytes B-2

Les lymphocytes B-2 folliculaires

Les lymphocytes B-2 folliculaires sont la population B majoritaire dans l'organisme. Ils sont localisés dans les follicules lymphoïdes des organes lymphoïdes secondaires et sont majoritairement responsables des réponses thymo-dépendantes spécifiques de l'antigène et de la mémoire immunitaire B.

Les lymphocytes B-2 de la zone marginale

Les MZ-B sont caractérisés par un phénotype $\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{lo}}\text{CD21}^{\text{hi}}\text{CD23}^{\text{lo}}\text{CD1d}^{\text{hi}}$ et $\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{lo}}\text{CD1c}^+\text{CD21}^{\text{hi}}\text{CD23}^{\text{lo}}\text{CD27}^+$ chez la souris et l'homme respectivement. Ils partagent à la fois des caractéristiques avec les B-1 et les B folliculaires. Ils présentent un BCR semi-variant ou peu diversifié, engendrant un répertoire antigénique restreint, peu spécifique de l'antigène mais polyréactif et biaisé vers des antigènes du soi et des déterminants microbiens conservés tels que le LPS ou le peptidoglycane des parois bactériennes. Cette propriété confère aux MZ-B un caractère de cellules innées, comme les B-1. On les retrouve ainsi chez l'homme idéalement positionnés dans des zones continuellement exposées aux antigènes microbiens, au niveau de la rate et des MALT notamment. Les MZ-B sont présents également dans le sang chez l'homme, indiquant une capacité de circulation des MZ-B. Chez la souris en revanche, les MZ-B sont restreints à la rate. Dans les organes lymphoïdes, la zone marginale est située stratégiquement entre les tissus lymphoïdes de la pulpe blanche et la circulation sanguine, faisant des MZ-B une des premières lignes de défense contre les antigènes des muqueuses et surtout du sang. Chez l'homme, les MZ-B expriment le CD27 et subissent des mutations somatiques, comme les B mémoires conventionnels. L'expression du CD27 sur les MZ-B apparaît progressivement pendant l'enfance au fur et à mesure des stimulations polyclonales et est observée sur la majorité des MZ-B de l'adulte. En effet, le pool de lymphocytes B de la MZ est peu renouvelé à partir des cellules médullaires, les MZ-B présentant une longue durée de vie. Comme les B-1, les MZ-B IgM^+ expriment peu l'IgD. Les MZ-B sont impliqués dans la lutte anti-infectieuse, notamment à germes encapsulés type *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Neisseria meningitidis*. Ils sont responsables de réponses thymo-indépendantes mais également thymo-dépendantes. Tout comme les B-1, les MZ-B peuvent produire des anticorps « naturels » en dehors de toute infection ou immunisation, et permettent la clairance rapide de débris cellulaires apoptotiques ou de microorganismes commensaux pénétrant la barrière muqueuse

168.

Les lymphocytes B-1 et les MZ-B sont donc les premières défenses de l'organisme pendant le laps de temps nécessaire à l'apparition des anticorps spécifiques de l'antigène produits par les lymphocytes B-2 conventionnels.

Tableau 6. Caractéristiques des principales populations de lymphocytes B

	B-1	B-2 folliculaires	B-2 de la zone marginale
Phénotype	Souris B-1a : CD5 ⁺ CD11b ⁺ CD45RA ^{lo} IgM ^{hi} IgD ^{lo} CD23 ⁻ CD43 ⁺ Souris B-1b: CD5 ⁻ CD45RA ^{lo} IgM ^{hi} IgD ^{lo} CD23 ⁻ CD43 ⁺ Homme : CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ^{lo/int} CD43 ⁺		Souris : IgM ^{hi} IgD ^{lo} CD21 ^{hi} CD23 ⁻ CD1d ^{hi} Homme : IgM ^{hi} IgD ^{lo} CD1c ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ⁻ CD27 ⁺
Production initiale	Omentum et foie fœtaux	Foie fœtal	Foie fœtal
Mode de renouvellement à l'âge adulte	Autorenouvellement	Progéniteurs de la MO	Progéniteurs dans la MO mais peu de renouvellement, longue durée de vie
Répertoire du BCR	Restreint, reconnaissance multiple d'antigènes microbiens et du soi	Très diversifié, spécifique d'un antigène	Restreint, reconnaissance multiple d'antigènes microbiens et du soi
Localisation	Cavité péritonéale et pleurale ++ 5% des B spléniques	Organes lymphoïdes secondaires Sang périphérique	Rate ++ MALT Sang périphérique
Production spontanée d'immunoglobulines	Forte	Faible	Forte
Isotypes sécrétés	IgM >> IgA	IgG > IgM	IgM > IgG
Réponse thymo-dépendante	Non	Oui	Parfois
Réponse thymo-indépendante	Oui	Non	Oui
Hypermutation somatique	Faible ou nulle	Importante	Oui chez l'homme
Développement de cellules mémoires	Faible	Oui	Faible

2) Ontogénie des sous-populations lymphocytaires B

a) Lymphocytes B-1

Les B-1 apparaissent plus précocement que les B-2 au cours du développement fœtal. Les précurseurs des B-1 sont produits par le foie fœtal et l'omentum fœtal. Le lien entre les précurseurs des B-1 et des B-2 présents dans le foie fœtal a longtemps été débattu, mais l'hypothèse la plus probable est qu'il existe des précurseurs spécifiques de chacune des lignées ¹⁶⁹. L'activité des précurseurs de B-1 est restreinte aux périodes fœtale et péri-natale. Leur proportion diminue drastiquement par la suite. Le développement des B-1 repose alors sur leur capacité d'auto-renouvellement et a lieu au niveau des cavités pleurales et péritonéales, indépendamment de la moelle osseuse ¹⁷⁰. Néanmoins, de rares précurseurs des B-1 présents dans la moelle osseuse pourraient contribuer au renouvellement du pool de B-1, notamment B-1b. Il est à noter que les phénomènes d'auto-renouvellement et de peuplement des cavités séreuses paraissent dépendre de la rate, puisqu'un déficit majeur en B-1 est observé chez les souris aspléniques ¹⁷¹. Enfin, les B-1 seraient sélectionnés en périphérie par leur reconnaissance d'antigènes du soi et de forts signaux du BCR ¹⁶⁷.

b) Lymphocytes B-2

Contrairement aux B-1, le pool de lymphocytes B-2 est renouvelé en continu à partir de progéniteurs médullaires. La maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse est rythmée par le réarrangement des segments des gènes des immunoglobulines. Les segments géniques codant pour la chaîne lourde des Ig (chaîne H pour « heavy ») sont regroupés en trois régions V_H (variabilité), D_H (diversité) et J_H (jonction). Ceux de la chaîne légère des Ig (chaîne L pour « light ») sont répartis entre les régions V_L et J_L . Le réarrangement aléatoire d'un segment génique de chacune de ces régions (diversité combinatoire) ainsi que les mutations ponctuelles apparaissant lors de la jonction des segments sélectionnés (diversité jonctionnelle) permet de synthétiser plus de 5×10^{13} immunoglobulines différentes capables de reconnaître autant d'antigènes différents. Ceci constitue le répertoire B. Trois stades de maturation sont ainsi définis en fonction de ce réarrangement. Les progéniteurs lymphoïdes de la moelle osseuse donnent naissance aux **cellules pro-B** lors des premiers réarrangements $D_H \rightarrow J_H$ de la chaîne lourde μ des immunoglobulines. Le réarrangement $V_H \rightarrow DJ_H$ permet la synthèse d'une chaîne lourde complète et signe le passage au **stade pré-B**. La chaîne lourde s'associe aux chaînes transmembranaires Ig- α et β (CD79a et CD79b) ainsi qu'à une pseudo-chaîne légère ψL pour former un récepteur provisoire (pré-BCR), exprimé à la surface des cellules pré-B. Le réarrangement des segments géniques du locus κ puis éventuellement λ engage les cellules pré-B vers le stade de **cellules B immatures**. L'assemblage des chaînes lourdes et légères nouvellement synthétisées permet la formation d'une IgM complète, exprimée à la surface des cellules B immatures, et constituant le récepteur des cellules B « BCR » ¹⁷² (**Fig.19**).

L'affinité du BCR aux antigènes du soi est le mécanisme majeur de sélection des lymphocytes B-2 au cours de leur développement. Ainsi, dans la moelle osseuse, une liaison du BCR des B immatures à un antigène du soi avec une trop forte affinité entraînera l'arrêt de la différenciation de la cellule B (délétion clonale centrale) ou le réarrangement sur le second allèle de la chaîne légère des Ig afin de générer un BCR avec une nouvelle spécificité antigénique ("receptor editing"). Les cellules qui reconnaissent fortement les antigènes du soi malgré ce second réarrangement entrent en apoptose. Ceci est le phénomène de **tolérance centrale**.

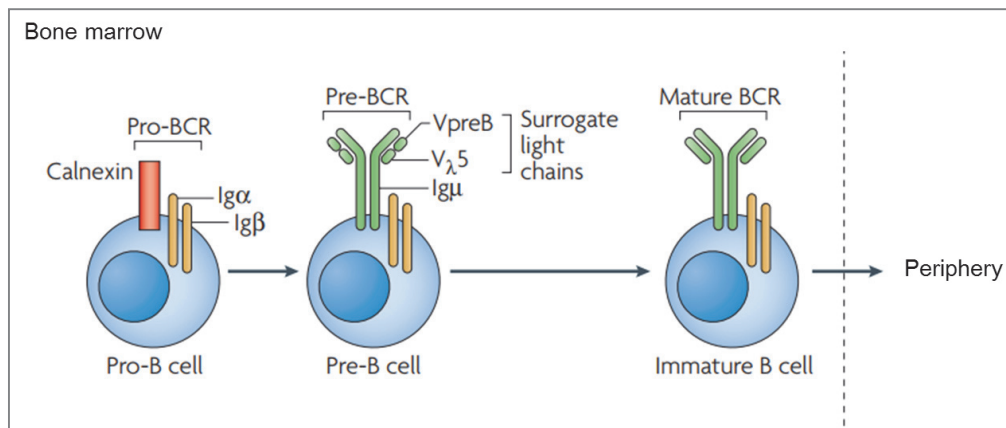


Figure 19. Développement des lymphocytes B-2 dans la moelle osseuse ¹⁷³

Les lymphocytes B immatures sélectionnés quittent la moelle osseuse et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour y rencontrer un antigène. Avant cette rencontre, les B immatures subissent une maturation progressive, pendant laquelle ils sont désignés comme « **lymphocytes B transitionnels** ». Les B transitionnels représentent une population hétérogène de cellules dont 3 sous-populations T1, T2 et T3 ont été identifiées, selon leur stade de maturation (**Fig.20**). Cette maturation se déroule au niveau de la rate chez la souris, et dans la moelle osseuse ou le sang périphérique chez l'homme ¹⁷⁴. Chez l'homme, les T1 expriment l'IgD et le CD10 en plus du BCR IgM. Leur forte expression de CD24 et CD38 est souvent utilisée pour leur identification, et doit être couplée au CD27 pour les différencier des populations mémoires à IgM. La maturation du stade T1 à T2 puis T3 est caractérisée par la diminution progressive de l'expression du CD10, du CD5 et de l'IgM parallèlement à l'apparition du CD22, CD44, CD21 et CD23. Chez l'homme, les B transitionnels matures se dirigent ensuite vers la rate pour se différencier en B matures naïfs de type « B-2 », *i.e.* lymphocytes B folliculaires et B de la zone marginale ¹⁷⁵.

Les lymphocytes B-2 peuvent également être sélectionnés pendant les stades transitionnels au niveau périphérique, notamment au stade T1. Un BCR de trop forte affinité pour le soi entraînera l'élimination de la cellule B par apoptose. C'est le cas d'environ 20 à 40% des lymphocytes B transitionnels. Une affinité intermédiaire peut conduire à l'internalisation des IgM et à l'anergie du lymphocyte B ou à l'orientation du B transitionnel vers la population de MZ-B, comme décrit ci-dessous. C'est le phénomène de **tolérance périphérique** ¹⁷⁶. Les signaux de survie dispensés par le récepteur du facteur d'activation des B (BAFF-R) jouent un rôle central dans ce processus.

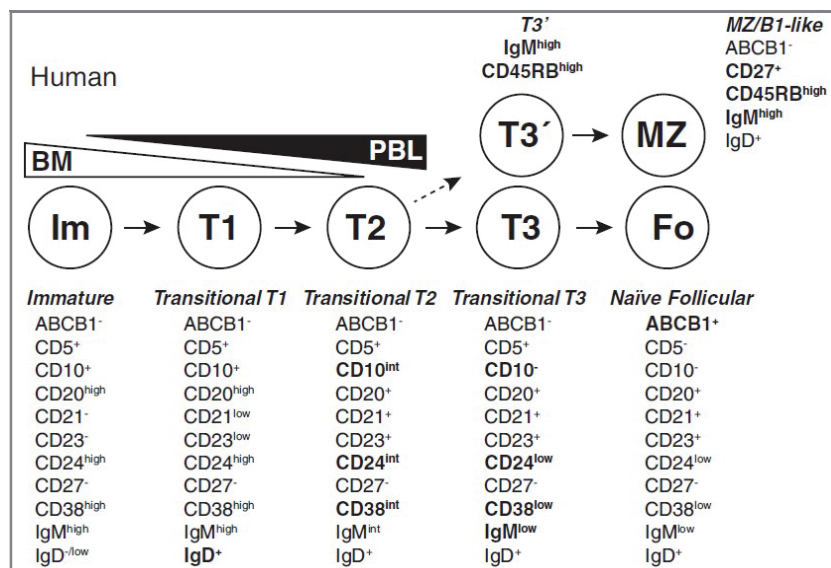


Figure 20. Stades de maturation des lymphocytes B chez l'homme ¹⁷⁴

Maturation des B transitionnels chez l'homme, au niveau de la moelle osseuse ou du sang périphérique. Les modifications d'expression de marqueurs importantes pour définir les différents stades apparaissent en gras. Les populations T3 et T3' diffèrent par les niveaux d'expression du CD45RB et de l'IgM.

Deux hypothèses sont décrites pour la différenciation des B immatures vers la population folliculaire ou MZ-B. La première hypothèse implique la réactivité du BCR pour les autoantigènes et l'activation parallèle de BAFF-R. Les signaux issus d'un BCR de faible spécificité pour les autoantigènes associés à ceux BAFF-R entraînent la survie du B transitionnel. De plus ces signaux activent la Bruton Tyrosine Kinase (BTK) qui inhibe NOTCH2 (Neurogenic locus notch homolog protein 2), inducteur de la différenciation des B immatures en MZ-B. A l'inverse, un BCR ayant une plus forte affinité pour les autoantigènes n'induit pas la BTK, laissant la voie libre à l'activation de NOTCH2. La deuxième hypothèse implique une sensibilité différente à certaines cytokines chez les B folliculaires et les MZ-B. En effet, les cellules dendritiques folliculaires synthétisent du CXCL13 qui attire les B exprimant CXCR5 dans le follicule. Contrairement aux B folliculaires, les MZ-B expriment d'une part fortement le récepteur de la sphingosine-1-phosphate (S1P), qui interfère avec la voie du CXCR5 et retient les MZ-B dans la zone marginale, et d'autre part les récepteurs VLA4 (Very late antigen 4) et LFA1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) fixant les molécules d'adhésion présentes sur les cellules stromales de la zone marginale ¹⁶⁸.

3) Activation et fonctions des sous-populations lymphocytaires B

a) Lymphocytes B-1

Les lymphocytes B-1a

En l'absence d'infection ou d'immunisation, les plasmablastes dérivés des B-1a sécrètent en continu de grandes quantités d'IgM polyclonales naturelles au niveau des muqueuses, indépendamment de l'exposition à des antigènes étrangers. Le CD5 est un régulateur négatif du BCR,

qui empêche sa multimérisation et inhibe les signaux d'activation spécifiques de l'antigène. Les anticorps produits présentent peu de mutations somatiques. Ils ont un répertoire limité, dirigé contre des motifs conservés d'antigènes de l'environnement ou des autoantigènes. La capacité de ces IgM à reconnaître des antigènes du soi leur confère une fonction homéostatique d'élimination des débris cellulaires apoptotiques et des molécules nocives du soi. Ils facilitent notamment la prise en charge de ces composants par les cellules dendritiques tolérogènes. Les B-1 produisent spontanément de l'IL-10 et d'autres composants immunomodulateurs tels que l'adénosine ou l'IL-35¹⁷⁷. Ce rôle immunorégulateur des B-1a prévient l'établissement de situations d'inflammations incontrôlées ou d'auto-immunité. Par ailleurs, ces IgM empêchent l'effraction des barrières muqueuses par les bactéries, notamment celles de la flore commensale, par leurs propriétés neutralisantes et opsonisantes, et leur capacité à activer le complément. Les B-1a représentent donc une première barrière de protection et jouent un rôle passif dans la réponse anti-infectieuse. Ces différentes propriétés protectrices et régulatrices font des B-1a de véritables acteurs de la réponse innée de l'hôte.

Néanmoins, plus récemment on a découvert un rôle plus actif des B-1a dans la réponse anti-infectieuse. En effet, un recrutement de B-1a a été observé au niveau des ganglions médiastinaux lors d'infections à *Influenzavirus*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Escherichia coli* dans des modèles murins¹⁷⁷. Ces B-1a produisent localement de grandes quantités d'IgM polyréactives. Elles permettent ainsi une prise en charge plus efficace des pathogènes par les phagocytes et les cellules dendritiques, potentialisant la réponse B folliculaire ultérieure¹⁷⁰. D'autre part, les B-1a peuvent stimuler les lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques via leur expression basale importante de la molécule de costimulation CD86¹⁶⁷. Au sein de ces cellules B-1a jouant un rôle actif anti-infectieux, il existe une sous-population appelée **lymphocytes B activateurs de la réponse innée (IRA-B)**. Lors de l'infection, l'activation des PRR, notamment du TLR4 par le LPS, induit la différenciation des B-1a en IRA-B. Ces derniers sont caractérisés par l'expression de B220, HLA-DR, CD5, CD43, CD93, VLA4, TLR4 et CD138. Ils expriment en revanche peu le CD23, le CD21 et l'IgD¹⁷⁸. Leur expression de VLA4 entraîne leur migration de la cavité péritonéale vers la rate, ou de la cavité pleurale vers les poumons. Le développement des IRA-B dans les cavités séreuses paraît dépendre de l'expression de BAFF-R, puisqu'aucun IRA-B n'est détecté en cas de déficit en BAFF-R. Il est intéressant de noter que les analyses transcriptomiques montrent que les IRA-B sont très similaires aux plasmocytes, par l'expression notamment de XBP1 et CD138¹⁷⁸. Une fois dans la rate ou les poumons, les IRA-B produisent du GM-CSF qui stimule de façon autocrine, par l'intermédiaire du récepteur CD131, la synthèse d'IgM polyréactives, facilitant ainsi l'élimination des particules virales ou des composés bactériens par les phagocytes. Les IRA-B synthétisent également de l'IL-3, qui favorise la production de monocytes et PNN au niveau médullaire, potentialisant la réponse inflammatoire aigüe anti-

infectieuse ¹⁷⁹. Les IRA-B sont considérés comme la source principale de GM-CSF dans la rate, et participent ainsi activement à l'activation, la différenciation et la prolifération des cellules myéloïdes, d'où leur dénomination. En dehors des contextes infectieux, une accumulation d'IRA-B a par ailleurs été observée dans des modèles murins d'athérosclérose au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les IRA-B seraient activés dans ce cas par reconnaissance de lipides oxydés via leur BCR ou des PRR. Les IRA-B activés stimulent les cellules dendritiques qui produisent de l'IL-12 favorisant une réponse Th1 athérogène. De plus, la production de GM-CSF par les IRA-B au niveau de la rate stimule une hématopoïèse extra-médullaire, entraînant une augmentation de PNN et monocytes circulants et au niveau de la plaque d'athérome ¹⁸⁰.

Les lymphocytes B-1b

Les lymphocytes B-1b représentent seulement 5 à 10% des B-1. Contrairement aux B-1a, ils jouent un rôle actif dans la réponse anti-infectieuse en induisant des réponses humorales thymo-indépendantes. En effet, le défaut d'expression de CD5 leur permet de répondre à une stimulation antigénique de leur BCR. La multimérisation des BCR par un antigène thymo-indépendant ainsi qu'un signal de costimulation délivré par des PRR ou des cytokines sont les éléments indispensables à la prolifération des B-1b (**Fig.21**). Une fois activés par l'antigène, les B-1b migrent jusqu'aux tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, notamment dans les ganglions mésentériques, et se différencient en plasmablastes synthétisant des IgM pouvant commuter en IgA, plus rarement en IgG. Les B-1b sont ensuite capables de générer une mémoire immunologique. En effet, chez les patients traités par Rituximab et déplétés en lymphocytes B, les concentrations sériques d'IgM et IgG spécifiques de l'antigène capsulaire du Pneumocoque restent stables, du fait de l'existence d'un pool de plasmocytes médullaires thymo-indépendants. De plus, chez les souris déficientes en lymphocytes B, le transfert de ces plasmocytes induit l'apparition d'IgM circulantes persistantes plusieurs mois et une protection contre l'infection à *Streptococcus pneumoniae* ¹⁸¹.

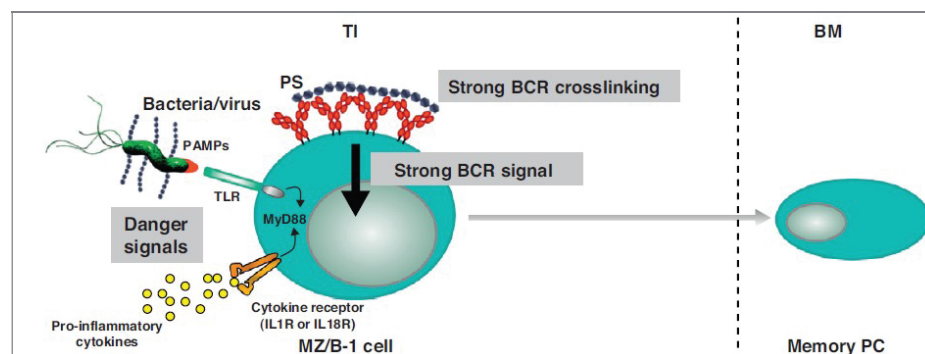


Figure 21. Signaux de différenciation vers les cellules mémoires dans les réponses thymo-indépendantes ¹⁸¹

b) Lymphocytes B-2

Lymphocytes B-2 folliculaires

Les lymphocytes B-2 folliculaires induisent une réponse humorale thymo-dépendante puisque leur activation nécessite la coopération avec les lymphocytes T CD4 auxiliaires préalablement activés par les cellules dendritiques dans la zone T. Dans la zone folliculaire, le lymphocyte B naïf capture un antigène spécifique par son BCR et l'internalise, puis l'apprête sur une molécule de CMH de classe II. Quand un lymphocyte T CD4 de la zone T bordant les follicules B reconnaît par son TCR l'antigène ainsi présenté, l'interaction B/T est renforcée par l'expression de molécules de costimulation, telles que CD80/CD86 liant CD28 du lymphocyte T. Cette interaction B/T entraîne l'expression de CD40L à la surface du lymphocyte T et sa synthèse de cytokines, induisant la prolifération et la maturation du lymphocyte B (**Fig.22a et b**). L'interaction CD40-CD40L est indispensable par la suite pour l'interaction avec les Tfh induisant le phénomène de commutation de classe ¹⁸².

Trois voies s'offrent aux lymphocytes B ayant proliféré. Certains sortent de la zone folliculaire et se différencient en plasmablastes/plasmocytes à courte durée de vie (**Fig.22c**). Cette réponse extra-folliculaire est peu associée au phénomène d'hypermutation somatique, les anticorps produits présentent donc une affinité modérée pour l'antigène. Ils sont majoritairement de classe IgM, mais la réponse extra-folliculaire peut éventuellement s'accompagner du phénomène de commutation de classe des Ig. La réponse extra-folliculaire est la source de la majorité des anticorps produits précocement et confère une protection rapide. En dehors de la réponse extra-folliculaire, certains lymphocytes B activés se différencient en B mémoires indépendamment du centre germinatif (**Fig.22d**). Enfin, certains B activés peuvent former un centre germinatif (**Fig.22e**). Dans le centre germinatif, les lymphoblastes prolifèrent intensément dans une région appelée zone sombre. Cette expansion clonale est associée à la diversification du BCR par phénomène d'hypermutation somatique. Les centroblastes migrent ensuite vers la zone claire du centre germinatif où ils sont dénommés centrocytes. Ils y subissent une sélection basée sur leur maturation d'affinité pour l'antigène, consécutive des mutations somatiques subies par leur BCR. Les centrocytes composés d'un BCR de forte affinité pour l'antigène présenté par les cellules dendritiques et les lymphocytes T auxiliaires folliculaires sont sélectionnés. Ces centrocytes matures peuvent entrer de nouveau dans un cycle du centre germinatif ou le quitter, en tant que lymphocytes B mémoires (**Fig.22f**) ou plasmocytes à longue durée de vie synthétisant des anticorps à haute affinité (**Fig.22g**). A la différence de la réponse extra-folliculaire, la réponse du centre germinatif est plus longue à se mettre en place mais confère une protection persistante à long terme. En effet, les lymphocytes B mémoires quittent les organes lymphoïdes secondaires et recirculent dans le sang périphérique dans

le but de déclencher une réponse plus rapide et intense en cas de nouvelle rencontre avec leur antigène spécifique. Quant aux plasmocytes à longue durée de vie, ils migrent dans la moelle osseuse pour y assurer une sécrétion d'anticorps continue pendant plusieurs années.

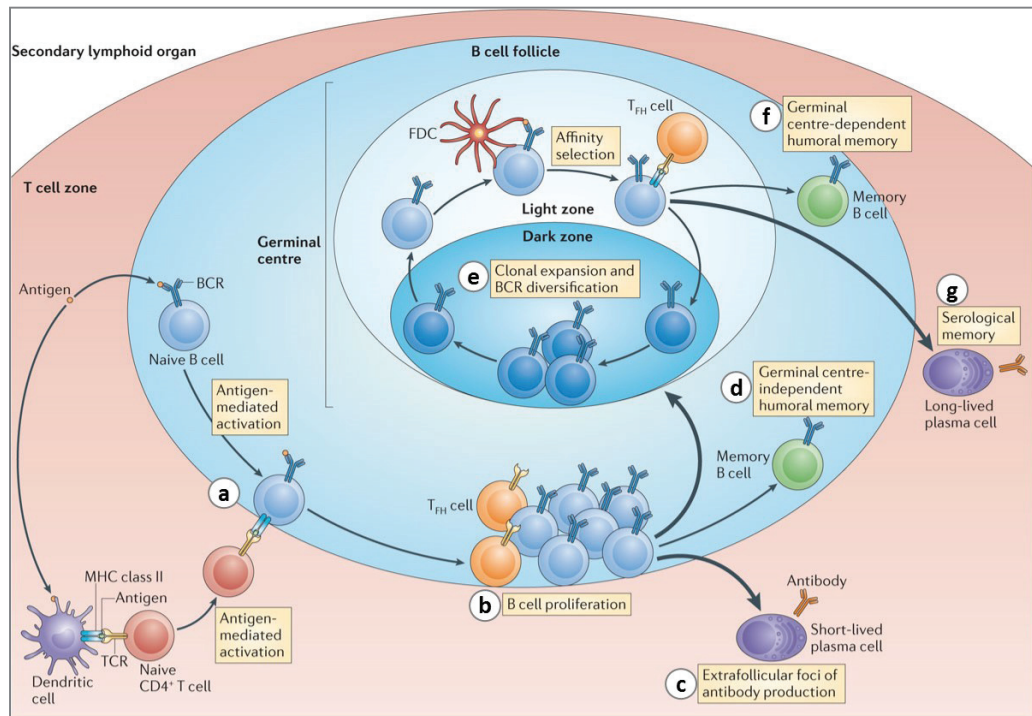


Figure 22. Réponse lymphocytaire B thymo-dépendante ¹⁸³

Lymphocytes B-2 de la zone marginale

La voie d'activation principale des MZ-B est **thymo-indépendante**. Les antigènes thymo-indépendant, comme les polysaccharides bactériens, entraînent l'agrégation des molécules de BCR à la surface du lymphocyte B et donc son activation sans coopération des lymphocytes T auxiliaires. Au niveau de la rate, les antigènes TI entrent dans la zone marginale et sont capturés par des cellules dendritiques, des macrophages et des polynucléaires auxiliaires. Ces cellules présentent l'antigène au BCR et aux TLR des MZ-B. Les MZ-B sont par ailleurs capables de prendre en charge des antigènes de façon autonome. Les cellules présentatrices d'antigène sécrètent différents facteurs solubles induisant la survie, la commutation de classe, le phénomène d'hypermutation somatique (uniquement chez l'homme) ainsi que la différenciation en plasmablastes des MZ-B. En effet, les plasmablastes issus de la différenciation des MZ-B produisent principalement de grandes quantités d'IgM, mais peuvent aussi produire des IgG et IgA. Ces facteurs sont BAFF (B cell-activating factor) et APRIL (a proliferation-inducing ligand) qui activent le récepteur TACI (transmembrane activator and CAML interactor), ainsi que l'IL-21, l'IL-6, IL-10 et CXCL10 (**Fig.23**) ¹⁶⁸.

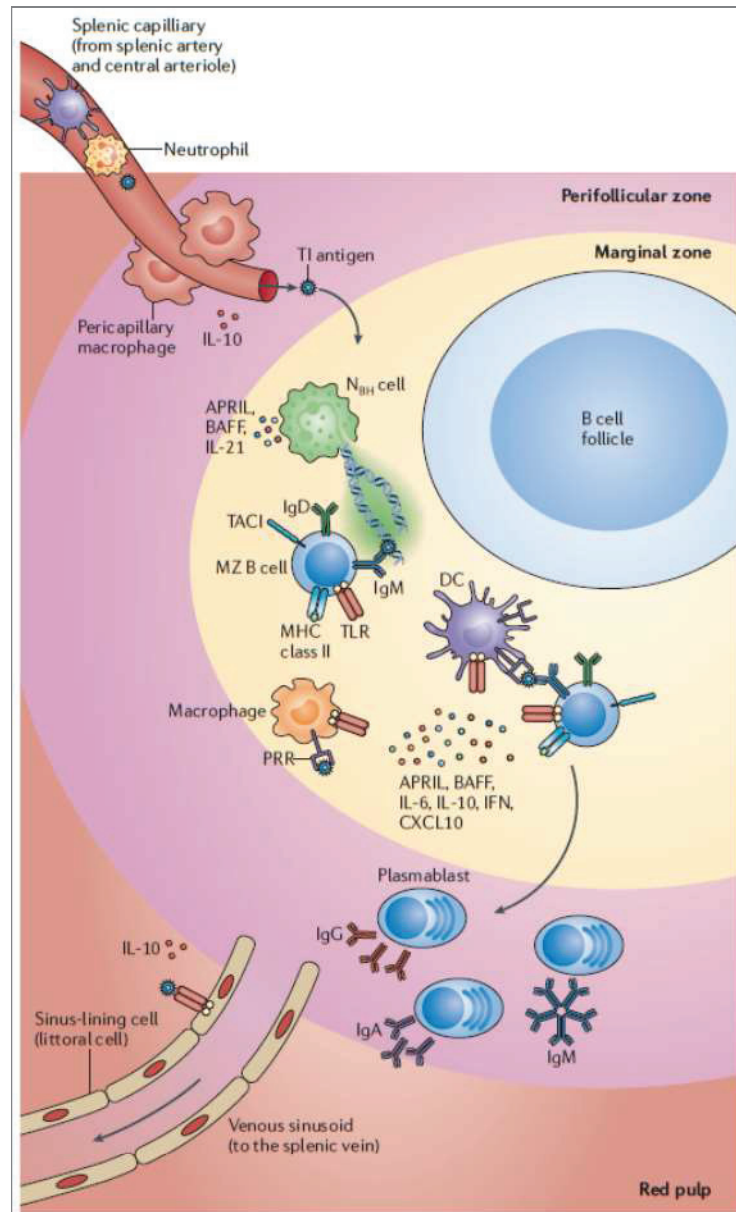


Figure 23. Réponse thymo-indépendante des lymphocytes B de la zone marginale chez l'homme ¹⁶⁸

Les MZ-B peuvent coopérer avec les lymphocytes T ou les NKT et par conséquent être impliqués dans des **réponses thymo-dépendantes**, néanmoins plus rarement que dans les réponses TI. En effet, contrairement aux B folliculaires, les MZ expriment constitutivement des taux élevés de molécules de costimulation CD80, CD86 et CMH de classe II à leur surface, probablement lié à leur exposition continue à des ligands TLR microbiens ou du soi. Ainsi, elles ont une activité de présentation de l'antigène très important. La réponse TD des MZ-B peut être **extra-folliculaire**. D'une part, les cellules dendritiques de la zone marginale DCIR2⁺ capturent les antigènes protéiques et les présentent aux T CD4 naïfs pour qu'ils se différencient en Th2 exprimant le CD40L et l'IL-4. En parallèle, elles présentent l'antigène au BCR des MZ-B. Les MZ-B s'activent et présentent à leur tour l'antigène aux lymphocytes Th2. L'interaction avec un Th2 de la même spécificité antigénique

entraîne la production rapide d'IgG1 de faible affinité par les MZ-B mais pas d'IgM (**Fig.24a**). D'autre part, les MZ-B peuvent capter des antigènes glycolipidiques et les présenter via leur CD1d aux NKT invariants (iNKT). Les iNKT activés se mettent alors à produire de l'IL-4 et de l'IFN γ et à exprimer le CD40L, induisant la différenciation des MZ-B en plasmablastes sécrétant des IgM ou IgG de faible affinité (**Fig.24b**). Par ailleurs, la réponse thymo-dépendante des MZ-B peut être **intra-folliculaire**. La capture par les MZ-B des antigènes protéiques liés au complément entraîne la diminution de l'expression de leur récepteur de sphingosine- 1-phosphate, facteur retenant les MZ-B au niveau de la zone marginale. Les signaux du CXCR5 deviennent alors prédominants et déclenchent l'entrée des MZ-B au niveau du follicule. Dans les follicules, les MZ-B transmettent l'antigène protéique aux cellules dendritiques folliculaires puis réexpriment les récepteurs de S1P, ce qui les ramène dans la zone marginale (**Fig.24c**). Par ce phénomène, les MZ-B permettent aux cellules dendritiques folliculaires d'initier une réponse TD dans le centre germinatif, en sélectionnant un lymphocyte B folliculaire présentant un BCR de haute affinité, ce qui conduira à la synthèse de cellules B mémoires et plasmocytes à longue durée de vie (**Fig.23**). Enfin, certains Tfh sont présents hors du follicule, et peuvent interagir directement avec les MZ-B qui leur présentent un antigène protéique. Cette interaction active les MZ-B qui se différencient en plasmablastes synthétisant au niveau extra-folliculaire des IgM et IgG de faible affinité, ou initient une réaction au niveau du centre germinatif (**Fig.24d**)¹⁶⁸.

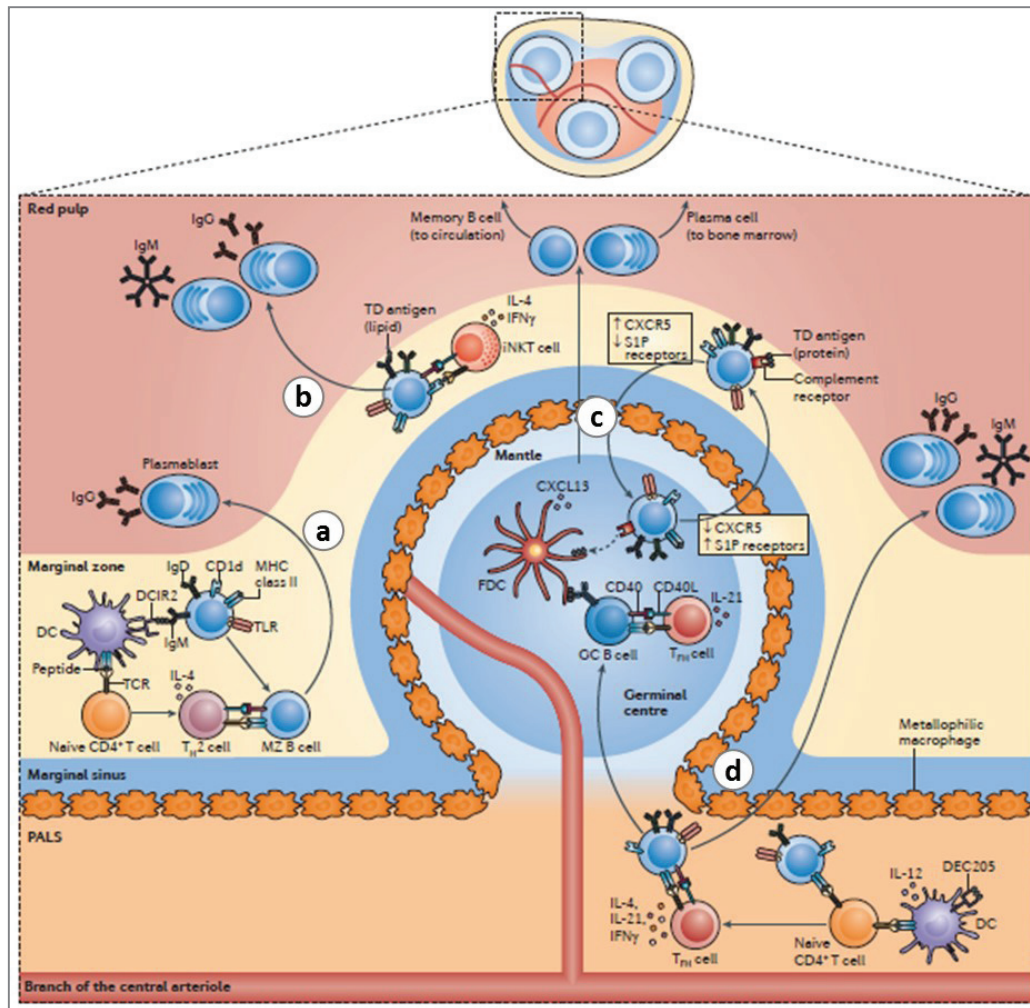


Figure 24. Réponse thymo-dépendante des lymphocytes B de la zone marginale chez la souris ¹⁶⁸

Les MZ-B ont donc une action très polyvalente. Ils reconnaissent une palette large d'antigènes thymo-dépendants et indépendants, ont un rôle dans le transport local au sein de la rate des antigènes jusqu'aux follicules, et sont ainsi capables d'initier à la fois des réponses thymo-indépendantes rapides de faible affinité et des réponses thymo-dépendantes générant des cellules mémoires et des plasmocytes à longue durée de vie, contrairement à ce qui a longtemps été pensé ¹⁸¹. La nature de l'antigène paraît importante dans l'engagement des MZ-B dans la voie thymo-dépendante ou indépendante ¹⁶⁸.

4) Facteurs de survie et activation des lymphocytes B

APRIL et **BAFF** sont les deux facteurs fondamentaux régulant la survie et l'activation des cellules B. BAFF se lie aux récepteurs **BAFF-R**, **TACI** et avec une affinité moindre à **BCMA** (B-cell maturation antigen), présents à la surface des lymphocytes B. APRIL interagit uniquement avec TACI et BCMA, ainsi qu'avec certains protéoglycanes. Le rôle des facteurs BAFF et APRIL ainsi que de leurs différents récepteurs dans la physiologie des cellules B est synthétisée dans la **figure 25**.

BAFF-R est un signal de survie pour les lymphocytes B alors que TACI et BCMA les régulent négativement. En effet, un déficit en TACI ou un excès d'APRIL engendre des lymphoproliférations et l'apparition de néoplasie. En absence de BAFF-R, l'interaction de BAFF avec TACI et/ou BCMA inhibe la progression dans le cycle cellulaire, donc la capacité de prolifération des cellules exprimant ces récepteurs, et peut induire des molécules de mort cellulaire telles que Fas ¹⁸⁴.

Les cellules stromales de la rate sont les principales productrices de BAFF. Elles contrôlent ainsi la taille du pool de lymphocytes B circulants. Dans certaines situations, les cellules myéloïdes peuvent également synthétiser BAFF pour entraîner une accumulation transitoire locale de lymphocytes B, notamment au niveau des sites inflammatoires. Le **développement et la sélection médullaires** des cellules B sont indépendants de BAFF. BAFF-R n'apparaît qu'à la sortie de la moelle osseuse sur les B immatures. Il joue en revanche un rôle fondamental dans la **sélection périphérique** des B transitionnels et la formation des MZ-B, conjointement aux signaux du BCR. BAFF-R est également important pour les **réponses humorales thymo-dépendantes**. Un déficit en BAFF-R se traduit d'une part par une diminution de la survie des lymphocytes B folliculaires. D'autre part, au niveau de la rate, les centres germinatifs peuvent se former mais ne se maintiennent pas en raison d'une altération du réseau de cellules dendritiques folliculaires et de l'incapacité à piéger des antigènes. Au contraire, la **réponse humorale thymo-indépendante** paraît plutôt dépendre de TACI, puisque les centres germinatifs des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques se développent normalement en cas de déficit en BAFF-R et les taux d'IgA circulants sont normaux. De plus, TACI est exprimé par les MZ-B et son activation par APRIL et/ou BAFF produits par les PNN auxiliaires de la zone marginale est indispensable pour l'induction des réponses TI extrafolliculaires. APRIL et/ou BAFF pourraient également prolonger la survie des plasmablastes dérivés des B-1 et des MZ-B. Enfin, TACI et BAFF-R sont impliqués dans la **commutation de classe**, mais l'apparition des IgA semble dépendre de TACI exclusivement ¹⁸⁴.

Les **cellules à un stade plus mature** s'affranchissent progressivement de la dépendance du système BAFF/BAFF-R en le remplaçant par l'axe APRIL/BCMA. Après l'activation des B folliculaires matures par la reconnaissance d'un antigène, BCMA joue un rôle dans leur sélection au niveau du centre germinatif, comme le montre l'association de son expression à celle de Fas ¹⁸⁵. Ensuite, les plasmablastes expriment BAFF-R mais également BCMA, et ainsi peuvent survivre grâce aux signaux de BAFF ou APRIL indistinctement. Enfin, la survie des plasmocytes à longue demi-vie médullaires est sous l'influence unique d'APRIL puisqu'ils n'expriment que BCMA. Le recrutement d'APRIL est facilité par son interaction avec le CD138, un protéoglycane de la surface des plasmocytes. Les B mémoires sont quant à eux quasiment indépendant de BAFF et APRIL pour leur survie ¹⁸⁴.

La voie BAFF/BAFF-R est également impliquée dans la **survie des B autoréactifs**. Ces derniers requièrent des signaux de survie plus importants que les autres cellules B et sont généralement

éliminés. En revanche, dans un contexte de production accrue de BAFF ou si les cellules autoréactives sont les seules présentes dans l'environnement, elles reçoivent suffisamment de signaux de BAFF-R pour survivre et atteindre les follicules B ou la zone marginale, où elles auront plus de chance de rencontrer un antigène qui induise leur activation¹⁸⁴.

Enfin, il est à noter que BAFF-R joue le rôle de molécule de costimulation sur les lymphocytes T et les Tregs, et voit son expression augmenter sur les cellules activées. La stimulation de lymphocytes T par BAFF induit la sécrétion d'IL-2 et d'IFN γ , et l'expression de CD25¹⁸⁴.

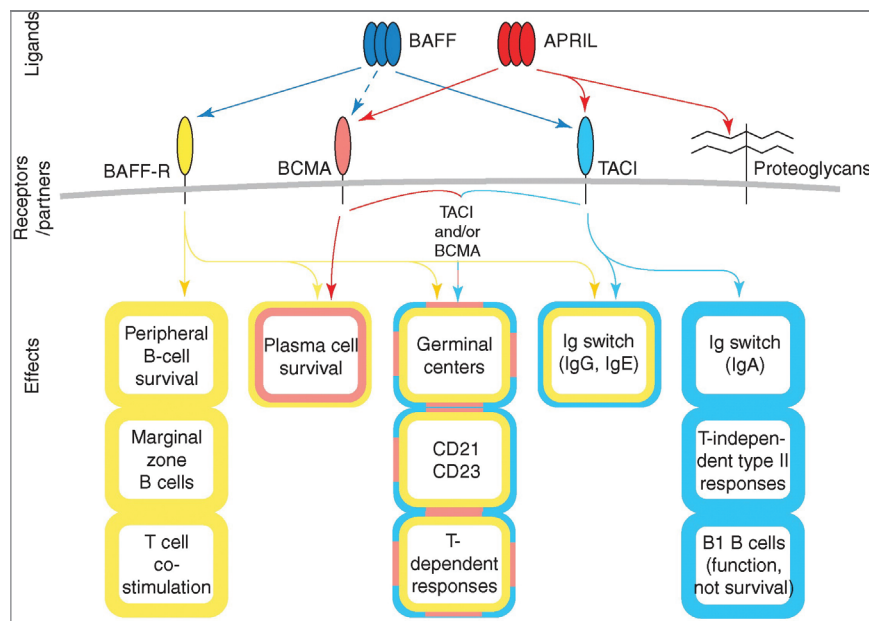


Figure 25. Rôles d'APRIL et BAFF dans l'activation lymphocytaire B¹⁸⁴

Les conséquences phénotypiques et fonctionnelles de BAFF ou APRIL sont présentées dans des encadrés colorés selon le récepteur impliqué.

5) Physiologie des cellules sécrétrices d'anticorps

a) Il existe deux populations de cellules sécrétrices d'anticorps

Dans le sang périphérique de l'homme, il est possible de détecter deux populations de cellules B capables de synthétiser des anticorps (ASC) : les **plasmablastes** CD20⁺/CD27^{hi}CD38^{hi}CD138^{low} et les **lymphocytes B-1**. Ces deux populations partagent des caractéristiques communes telles que la possibilité de synthétiser à la fois des IgM et des IgG, ainsi que la surexpression de *XBPI*, *Blimp-1* et *IRF4*, gènes associés à la sécrétion d'anticorps. En revanche, les B-1 diffèrent des plasmablastes sur différents aspects. Ils ne présentent pas la morphologie typique des cellules plasmocytaires. Les immunoglobulines synthétisées par les B-1 contiennent beaucoup moins de mutations somatiques que celles des plasmablastes. Une stimulation polyclonale *ex vivo* engendre une sécrétion accrue d'anticorps par les B-1, notamment d'IgM, alors que les plasmablastes y sont insensibles. La stimulation *ex vivo* par des cytokines IL-2, IL-6 et IL-15 connues pour induire la différenciation plasmocytaire ne modifie pas l'expression de CD20 et CD138 chez les B-1, alors que

les plasmablastes perdent le CD20 et acquièrent le CD138, phénotype typique des plasmocytes matures. Enfin, contrairement aux plasmablastes, les B-1 ne sont pas des cellules mémoires ¹⁸⁶.

b) Transition du stade lymphocyte B au stade plasmablaste

La transition entre le stade de lymphocyte B, folliculaire ou MZ-B, et celui de plasmablastes se traduit par une régulation coordonnée de l'expression de plusieurs centaines de gènes. Il existe des gènes spécifiques de chacun des deux stades cellulaires, généralement antagonistes les uns des autres. Parmi les facteurs de transcription associés au stade lymphocyte B, PAX5 et Bcl-6 sont fondamentaux. **PAX5** joue un rôle clé dans l'engagement du progéniteur lymphoïde dans la lignée B et par conséquent est exprimé dans tous les stades immatures. Dans les B matures, il régule l'expression de composants du BCR tels que CD79a, CD19 et CD21 ainsi que celles de nombreux facteurs de transcription. Notamment, PAX5 prévient la différenciation des B matures vers le stade ASC en activant **BACH2**, inhibiteur de l'expression de *Blimp-1*, et en réprimant l'expression d'autres gènes caractéristiques des ASC tels que *Flt3*, *Ccr2* et *Cd28*. L'extinction de *Pax5* ou l'inhibition de la fonction de PAX5 est nécessaire pour initier la transition du B vers le stade d'ASC. **Bcl-6** est fortement exprimé dans les lymphocytes B du centre germinatif. Il facilite leur prolifération et améliore leur tolérance aux hypermutations somatiques en inhibant les réponses aux dommages à l'ADN. En effet, il se lie à des régions régulatrices des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes tels que *p53*, *Myc* et *Bcl2*. Bcl-6 agit également sur la différenciation des B en ASC puisqu'il cible *Blimp-1*. L'IL-21 et IRF8 entretiennent l'expression de Bcl-6 alors qu'IRF4 et Blimp-1 la répriment. À part PAX5 et Bcl-6, il existe d'autres facteurs spécifiques des B et réprimés lors de la différenciation en ASC tels que OBF1, OCT2, PU.1, SPIB, ETS1 et IRF8.

Trois facteurs principaux sont impliqués dans la répression du programme transcriptionnel des B en faveur de celui des ASC, favorisant la synthèse de grandes quantités d'Ig, la migration et la survie dans la moelle osseuse. **IRF4** fonctionne de façon dose-dépendante, un faible niveau d'IRF4 stimulant la commutation de classe et la formation du CG alors que de fortes concentrations d'IRF4 inhibent Bcl-6 et induisent Blimp-1 en faveur de la différenciation en ASC. **Blimp-1** est exclusivement exprimé dans les ASC, les plasmablastes présentant un niveau d'expression de Blimp-1 beaucoup plus bas que les plasmocytes à longue durée de vie. Blimp-1 n'est pas nécessaire pour l'initiation de la différenciation des B en plasmablastes, mais indispensable pour la formation de plasmocytes matures. Il inhibe l'expression des facteurs de transcription caractéristiques des B, notamment Bcl-6 et PAX5. Dans les plasmocytes, il serait impliqué dans la présentation antigénique et la réponse au stress cellulaire. Enfin, **Xbp1** est nécessaire à la sécrétion d'immunoglobulines et le remodelage du réticulum endoplasmique caractéristique des ASC. Il est réprimé par PAX5 dans les lymphocytes B, jusqu'à ce que l'expression de celui-ci diminue lors de l'engagement vers le stade d'ASC.

Il est à noter que ces facteurs de transcription ne sont pas exprimés de façon identique dans toutes les populations lymphocytaires B. En particulier, les lymphocytes B-1 et les MZ-B présentent une expression de Blimp-1 supérieure et une expression de PAX5 et Bcl-6 inférieure aux lymphocytes B folliculaires, ce qui corrèle avec leur faculté de synthétiser des anticorps plus rapidement et intensément que les B folliculaires.

c) Différenciation du plasmablaste en plasmocyte

La majorité des plasmablastes produits suite à ces modifications transcriptionnelles se différencient en plasmocytes à courte durée de vie. Un certain nombre peut néanmoins donner naissance à des plasmocytes à longue durée de vie, résidant dans des niches spécialisées de la moelle osseuse où ils persistent pendant des années voire une vie entière. Ils ne sont pas éliminés par les anticorps monoclonaux anti-CD20 comme le Rituximab, contrairement aux plasmocytes à courte durée de vie. Les plasmocytes à longue durée de vie sont majoritairement issus des réactions dépendantes du centre germinatif, mais des données suggèrent que les MZ-B et les B-1 peuvent également induire leur génération par une voie thymo-indépendante ¹⁸¹. Par ailleurs, la synthèse d'IgM est majoritairement liée aux plasmocytes à courte demi-vie, mais il existe également des plasmocytes à longue demi-vie synthétisant des IgM. Les plasmocytes à longue durée de vie sont à un stade de différenciation terminal et ne peuvent plus proliférer, contrairement aux plasmablastes. Ils répriment donc les gènes impliqués dans le cycle cellulaire (*e.g. Myc*) et leur survie est dépendante de signaux tels que l'IL-6 et les ligands de CD44, produits par le microenvironnement de la niche. Les plasmocytes expriment CD28 ainsi que ses ligands CD80 et CD86. Ces molécules semblent réguler négativement la sécrétion d'anticorps. Néanmoins, sur les plasmocytes malins, CD28 prévient leur apoptose induite par les cytostatiques.

La migration des plasmocytes jusqu'aux niches médullaires est peu comprise mais paraît associée à un changement de réponse par rapport aux cytokines spécifiques des tissus. En effet, l'expression des récepteurs aux cytokines du centre germinatif diminue, comme CXCR5, alors que celle du récepteur de la S1P augmente et permet la sortie des plasmablastes hors des organes lymphoïdes secondaires. Sur les plasmablastes du sang périphérique, on observe une augmentation de l'expression de CXCR4, dont le ligand CXCL12 produit par les cellules stromales médullaires permet la migration des ASC et leur rétention dans la moelle osseuse. Il est à noter que d'autres cytokines, notamment inflammatoires telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11, peuvent induire la migration des plasmablastes vers les sites infectés, notamment non lymphoïdes. La rétention des plasmablastes dans la moelle osseuse et leur maturation en plasmocytes impliquent l'expression de VLA4, CD44, CD28, CD93, ainsi que des facteurs de transcription KLF2, ZBTB20 et Aiolos. La survie des plasmocytes dans les niches est médiée par l'IL-6, le TNF- α , le monoxyde d'azote et surtout par

APRIL, interagissant avec BCMA. Ainsi, malgré le fait que la composition des niches médullaires soit toujours discutée, la présence d'une cellule stromale CXCL12⁺VCAM1⁺ et d'une cellule hématopoïétique sécrétant le facteur de survie APRIL semblent nécessaires. Les PN éosinophiles pourraient jouer ce rôle puisqu'ils colocalisent dans la moelle osseuse avec les plasmocytes et sécrètent de l'IL-6 et APRIL (**Fig.26**). La liaison d'APRIL avec BCMA entraîne l'expression d'une protéine anti-apoptotique MCL1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1), essentielle à la survie des plasmocytes. MCL1 présente une très courte demi-vie, ce qui implique que la persistance des plasmocytes requiert une stimulation continue par les signaux de la niche médullaire et notamment APRIL. Enfin, les plasmocytes expriment le récepteur inhibiteur FcγIIB, qui entraîne leur apoptose quand il est activé, suggérant que les anticorps soient impliqués dans la régulation de l'homéostasie des plasmocytes.

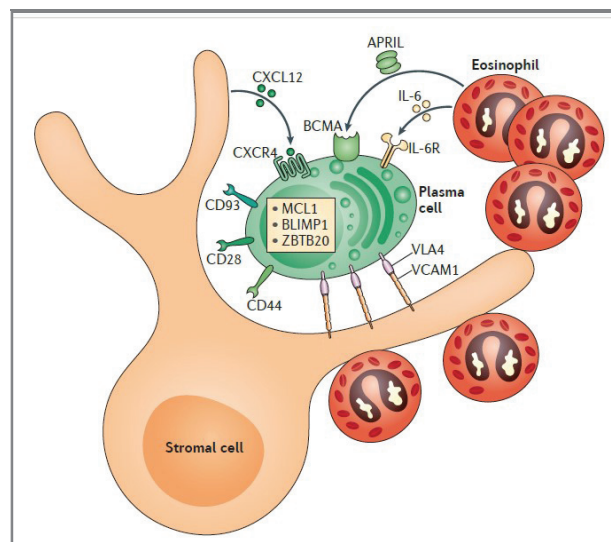


Figure 26. Modèle de survie des plasmocytes dans une niche médullaire ¹⁸⁷

B. Les cellules B régulatrices

1) Les lymphocytes B régulateurs

a) Découverte et intérêt

Le lymphocyte B est un acteur clé de la réponse immunitaire notamment anti-infectieuse de par son statut de cellule présentatrice d'antigène, sa capacité à synthétiser diverses cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 ainsi que ses nombreuses fonctions effectrices liées à la sécrétion d'immunoglobulines. En effet, les anticorps sont impliqués dans la neutralisation de pathogènes tels que les virus et toxines, l'opsonisation de bactéries permettant une reconnaissance et une

phagocytose facilitées par les cellules phagocytaires, l'activation des voies classique et alterne du système du complément et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. Plus récemment, une nouvelle sous-population de lymphocytes B a été mise en évidence, présentant au contraire des fonctions régulatrices de la réponse immunitaire, comme décrites pour les lymphocytes T régulateurs.

Les lymphocytes B « régulateurs » (Bregs) ont d'abord été décrits dans le contexte de maladies auto-immunes. Dans des modèles murins expérimentaux d'encéphalomyélite auto-immune (EAE) mimant la sclérose en plaque (SEP) humaine, les souris avec un déficit en lymphocytes B présentaient des formes plus sévères, non-rémittentes, par rapport aux souris contrôles ^{188,189}. Ce phénomène était lié à l'existence de lymphocytes B spléniques capables de produire des cytokines immunorégulatrices, principalement l'IL-10, inhibant la réponse cellulaire Th1 néfaste dans ce contexte et expliquant l'aggravation de la pathologie auto-immune lors de l'absence de lymphocytes B ¹⁸⁹. Ces lymphocytes B synthétisant de l'IL-10 furent les premières cellules reconnues comme lymphocytes B régulateurs. Un intérêt croissant pour la caractérisation de ces B régulateurs s'est ensuite développé, mené par la perspective de développer dans les contextes auto-immuns des thérapies ciblant les lymphocytes B produisant des cytokines inflammatoires et les plasmocytes potentiellement sources d'auto-anticorps pathogènes, tout en épargnant les lymphocytes B régulateurs bénéfiques. Ceci a permis depuis quelques années de révéler des mécanismes immunorégulateurs indépendant de la sécrétion d'IL-10, ainsi que la présence de Bregs dans d'autres contextes que l'auto-immunité.

b) Mécanismes immunorégulateurs et phénotypes particuliers

Synthèse d'IL-10

Le mécanisme immunorégulateur des lymphocytes B le plus étudié est la synthèse d'IL-10. Cette cytokine présente un rôle majeur dans la modulation des réponses immunitaires via l'inhibition de la synthèse de cytokines proinflammatoires, de l'expression des molécules de costimulation et de la présentation antigénique ¹⁹⁰. Les lymphocytes B synthétisant de l'IL-10 ont été observés dans des modèles murins expérimentaux d'EAE, mais également d'arthrite auto-immune ¹⁹¹ et d'inflammation chronique de l'intestin ¹⁹². Dans cette dernière étude, les lymphocytes B du tissu lymphoïde intestinal synthétisant de l'IL-10 présentaient une forte expression de CD1d à leur surface. Cette caractéristique a été retrouvée dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact médiée par les lymphocytes T, où les lymphocytes B synthétisant de l'IL-10 et entraînant une diminution de l'inflammation présentaient un phénotype particulier CD1d^{hi}CD5⁺ ¹⁹³. Localisés dans la rate et la cavité péritonéale mais absents du sang et des ganglions, ces lymphocytes B étaient présents également chez les souris contrôles, mais en plus faible proportion. Cette population spécifique de

Bregs est depuis appelée « lymphocytes B10 ». D'autres études ont décrits des lymphocytes B régulateurs spléniques CD1d^{hi}CD21^{hi}CD23^{hi}IgM^{hi}, capables de synthétiser de l'IL-10 et de réguler diverses pathologies auto-immunes *in vivo* ^{194,195}. Ce phénotype chevauche partiellement celui des B de la zone marginale, des B transitionnels T2 et des B1a mais en est néanmoins distinct. Chez l'homme, une sous-population de lymphocytes B circulants CD24^{hi}CD27⁺ et synthétisant de l'IL-10 a été décrite dans diverses pathologies auto-immunes comme l'analogue des B10 murins ^{196,197}. Chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, une sous-population CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} exprimant le CD1d a montré également des propriétés immunorégulatrices en inhibant *ex vivo* la libération d'IFN γ par les lymphocytes T CD4 ¹⁹⁸. Il est à noter que ces deux populations de B régulateurs sont également présentes chez les volontaires sains mais dans des proportions moindres.

D'autres sous-types de lymphocytes B ont également été associés à la synthèse d'IL-10, mais sans expression concomitante de CD1d. Chez la souris, les **lymphocytes B-1a** décrits précédemment ont un rôle à part entière dans la prévention des mécanismes inflammatoires ou auto-immuns, grâce à leur capacité de produire de l'IL-10, notamment au niveau des muqueuses intestinales. Un déficit en B-1a est associé au développement d'inflammation chronique de l'intestin chez la souris ¹⁷⁷. Par ailleurs, dans un modèle murin de diabète, les lymphocytes B régulateurs synthétisant de l'IL-10 expriment la molécule de costimulation **TIM-1** (T cell Ig domain and mucin domain protein 1). De façon intéressante, ces Bregs TIM-1⁺ incluent les B10 CD1d^{hi}CD5⁺, mais ne sont pas restreints à ce sous-type cellulaire. Ces lymphocytes B TIM-1⁺ synthétisent également de l'IL-4, favorisent une réponse Th2 et sont capables *in vivo* de prévenir le rejet de greffe d'îlots pancréatiques ¹⁹⁹. Les Bregs TIM-1⁺ ont aussi été observés dans un modèle murin de maladie du greffon contre l'hôte ²⁰⁰. Chez l'homme, TIM-1 est exprimé majoritairement à la surface des lymphocytes T et module la différenciation des lymphocytes T CD4 effecteurs. Néanmoins, des B régulateurs caractérisés par l'expression de TIM-1 ont été observés dans diverses pathologies, tels que la myasthénie ²⁰¹, le carcinome hépatocellulaire induit par l'HBV ²⁰², l'athérosclérose ²⁰³, la sclérodémie systémique ²⁰⁴ et le lymphome primitif du système nerveux central ²⁰⁵. Chez les patients lupiques, une autre population de lymphocytes B synthétisant spontanément de l'IL-10 a été décrite. Ces cellules B circulantes sont **CD11b**⁺ et inhibent *ex vivo* la production de TNF- α par des lymphocytes T activés ²⁰⁶. Enfin, de récentes analyses transcriptomiques ont identifiées **CD9** comme marqueur des Bregs IL-10⁺ ^{207,208}.

Synthèse d'autres facteurs solubles immunorégulateurs

L'existence de mécanismes immunorégulateurs indépendants de la synthèse d'IL-10 a été mise en évidence chez des souris déficientes en IL-10 et infectées par un helminthe. En effet, le transfert de lymphocytes B provenant de leurs ganglions mésentériques à d'autres souris issues de

modèles d'allergie et d'EAE a pour conséquence une régulation de la réponse allergique et une diminution de la sévérité clinique du modèle d'EAE ²⁰⁹.

Une analyse transcriptomique de Bregs spléniques induits par stimulation de CD40 et TLR4 *ex vivo* montre une expression augmentée d'EBi3 (Epstein-Barr virus induced protein 3), protéine s'associant à p35 pour composer l'**IL-35** ²¹⁰. Cette cytokine est connue pour son rôle dans le développement des lymphocytes Tregs et de leurs fonctions régulatrices ^{211,212}. Dans cette étude, les souris avec un déficit sélectif en IL-35 au niveau des lymphocytes B présentent une symptomatologie exacerbée dans les modèles expérimentaux d'EAE et une résistance accrue à l'infection à *Salmonella typhimurium*, avant et après vaccination ²¹⁰. Ce mécanisme immunorégulateur paraît associé à celui de l'IL-10 puisque les Bregs perdent leur capacité à atténuer l'EAE en cas de déficit en l'une ou l'autre des cytokines. Dans un modèle murin d'uvéite auto-immune, le transfert de Bregs IL-35⁺ protège les souris du développement de la maladie, et améliorent même la symptomatologie lorsqu'elle est déjà installée ²¹³. Dans ces deux études, l'effet bénéfique des Bregs IL-35⁺ provient de l'inhibition des réponses Th1 et Th17 délétères et de l'induction des Tregs. Chez l'homme, des lymphocytes B synthétisant de l'IL-35 ont été observés chez des patients atteints de cancer gastrique et colorectal ^{214,215}. De façon intéressante, leur proportion était corrélée à celle des Tregs, des MDSC et des lymphocytes B produisant de l'IL-10. Les Bregs IL-35⁺ ont également été observés chez des patients atteints de lèpre ²¹⁶ et de maladie inflammatoire chronique de l'intestin ²¹⁷.

Dans un modèle expérimental de souris diabétiques, le transfert de lymphocytes B activés *ex vivo* par LPS à des souris NOD prédiabétiques prévient le développement du diabète de type 1 par plusieurs mécanismes dont la sécrétion de **TGF-β**, qui altère notamment l'activité des cellules présentatrices d'antigènes ²¹⁸. La sécrétion de TGF-β par ces lymphocytes B activés par LPS induit également l'anergie des lymphocytes T CD8 *ex vivo* ²¹⁹. Dans un modèle murin d'allergie alimentaire, la sensibilisation allergénique entraîne l'apparition au niveau des muqueuses d'une population de lymphocytes B CD35⁺ exprimant la thrombospondine 1, une protéine d'adhésion cellulaire. Ces lymphocytes B induisent la différenciation des Tregs via la synthèse de TGF-β, indépendamment de l'IL-10, et régulent l'inflammation allergique intestinale *in vivo* ²²⁰. Chez l'homme, il est décrit une augmentation de la proportion de lymphocytes B synthétisant du TGF-β en réponse à la stimulation *ex vivo* de PBMC par de la caséine chez les patients non-allergiques, contrairement aux patients intolérants aux protéines de lait de vache, suggérant le rôle de ces lymphocytes B régulateurs dans les phénomènes allergiques non-médiés par IgE ²²¹. De plus, des lymphocytes B CD25^{hi}CD27^{hi}CD86^{hi}CD1d^{hi} du sang de volontaires sains sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T effecteurs et d'induire la différenciation de lymphocytes Tregs via la synthèse de TGF-β, indépendamment de l'IL-10 ²²².

Dans l'infection à *Trypanosoma cruzi*, les lymphocytes B sont la principale source d'**IL-17** lors du pic de parasitémie, et permettent ainsi le recrutement de PNN synthétisant de l'IL-10 qui limitent les dommages tissulaires au niveau hépatique. Aucune sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes B n'est détectée chez les souris non-infectées. *In vivo*, ces lymphocytes B améliorent le contrôle de l'infection et en diminuent la mortalité ²²³. Chez l'homme, cette population apparaît également *ex vivo* lors de la stimulation de lymphocytes B issus d'amygdales par des trypomastigotes ²²³.

Un des mécanismes immunorégulateurs utilisé par les lymphocytes Tregs est l'hydrolyse d'adénosine triphosphate en adénosine 5'-monophosphate puis en **adénosine** immunosuppressive. Cette réaction est catalysée par deux ectoenzymes, le **CD39** et le **CD73**. L'expression de CD39 est courante à la surface des lymphocytes B, contrairement à celle de CD73. Néanmoins, chez la souris ²²⁴ comme chez l'homme ²²⁵, des lymphocytes B CD39^{hi}CD73⁺ ont été mis en évidence. Comme les lymphocytes Tregs, ils sont capables de synthétiser de l'adénosine inhibant *ex vivo* la prolifération de lymphocytes T en coculture. *In vivo*, le transfert de cette sous-population B diminue la sévérité clinique d'un modèle murin de colite auto-immune. De façon intéressante, 30 à 50% des lymphocytes B10 décrits chez la souris paraissent exprimer CD73. De même, les lymphocytes B CD39^{hi}CD73⁺ humains activés *ex vivo* sont capables de synthétiser de l'IL-10 ²²⁶. La synthèse d'IL-10 n'est pas altérée par un déficit d'expression en CD73, alors que la synthèse d'adénosine est diminuée et associée à une diminution de l'expression de CD73 dans les lymphocytes B IL-10^{-/-} chez la souris. Ces observations suggèrent un lien potentiel entre les deux mécanismes immunorégulateurs. Les Bregs CD39^{hi}CD73⁺ synthétisant de l'adénosine ont été observés en clinique chez l'homme, notamment dans des carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou particulièrement immunosuppresseurs ²²⁷. Leur proportion était associée au type de chimiothérapie utilisé dans le traitement de ce cancer.

Des lymphocytes B exprimant le **granzyme B** ont été identifiés dans différents contextes chez l'homme: microenvironnement de tumeurs solides, transplantation rénale, infection à VIH, maladies auto-immunes ²²⁸⁻²³¹. La synthèse de granzyme B engendre la dégradation de la chaîne ζ du TCR et ainsi limite la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Ce mécanisme de régulation est déjà décrit pour les Tregs et les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Certains phénotypes particuliers ont été associés aux lymphocytes B synthétisant du granzyme B. En cancérologie, ces lymphocytes B sont CD38⁺CD1d⁺IgM⁺CD147⁺ et expriment également d'autres molécules régulatrices telles que l'IL-10, CD25, and indoleamine-2,3-dioxygénase ²³². Chez les patients VIH+ non traités, les lymphocytes B granzyme B⁺ ne synthétisent pas d'IL-10 et présentent un phénotype CD5⁺CD43⁺CD86⁺CD147⁺IL-10⁻

²³¹.

Induction de lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes B pourraient tirer leur mécanisme immunorégulateur de l'induction des lymphocytes T régulateurs. En effet, dans des modèles d'EAE, les souris présentant un déficit en lymphocytes B voient leur nombre de Tregs diminuer significativement dans la rate et développent des symptômes chroniques. Le transfert de lymphocytes B déficients en IL-10 corrige les symptômes et entraîne la prolifération des Tregs chez ces souris, démontrant un mécanisme indépendant de l'IL-10. Ces propriétés semblent dépendre de l'expression membranaire du ligand de GITR (glucocorticoid induced TNFR-related receptor), récepteur présent à la surface des Tregs et impliqué dans leur homéostasie ²³³. D'autres études *ex vivo* et *in vivo* sur différents modèles expérimentaux de maladies auto-immunes, d'allergie ou de transplantation suggèrent que les lymphocytes B régulent par ailleurs le nombre de Tregs en induisant l'expression de FoxP3 via la synthèse d'IL-10 ou de TGF- β ²³³⁻²³⁵. Une étude montre que des Bregs spléniques murins induits par *Helicobacter* favorisent la différenciation des lymphocytes T en Tregs synthétisant de l'IL-10 (Tr1) via la voie PD1/PD-L1 ²³⁶. Chez l'homme, les lymphocytes B CD25^{hi}CD27^{hi}CD86^{hi}CD1d^{hi} du sang de volontaires sains entraînent l'augmentation de l'expression de FoxP3 et CTLA-4 chez les Tregs et induisent leur différenciation par un mécanisme impliquant la synthèse de TGF- β et le contact cellulaire entre Bregs et Tregs ²²².

Expression de checkpoints inhibiteurs

L'interaction entre les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (T_{FH}) et les lymphocytes B activés dans les organes lymphoïdes secondaires est fondamentale dans la formation des centres germinatifs et le développement des réponses humorales. La forte expression de PD1 à la surface des T_{FH} et l'implication de cette voie dans le développement de lymphocytes T_{FH} régulateurs font de l'axe PD1/PD-L1 un mécanisme majeur de régulation de la réponse humorale ²³⁷⁻²⁴⁰. Récemment, il a été montré que les lymphocytes B avec une forte expression de **PD-L1** inhibent l'expansion des T_{FH} et la production d'anticorps, indépendamment de la synthèse d'IL-10 et de l'activation des autres populations cellulaires immunorégulatrices telles que Tregs et T_{FH} régulateurs. De plus, le transfert de ces lymphocytes B PD-L1^{hi} dans un modèle d'EAE diminue l'incidence et la sévérité du modèle. Ces lymphocytes B PD-L1^{hi} sont réfractaires au traitement par anticorps monoclonal anti-CD20 grâce à l'expression augmentée de TACI, BCMA et BAFF-R ²⁴¹. D'autre part, lors d'une infection à *Salmonella typhimurium* chez la souris, les bactéries persistent dans certaines cellules présentatrices d'antigènes de la rate, des ganglions mésentériques et de la moelle osseuse. Ces cellules infectées, et notamment les lymphocytes B, expriment PD-L1 et inhibent les lymphocytes T CD8 PD1⁺, empêchant la réponse effectrice spécifique médiée par ces lymphocytes T CD8 ²⁴². Enfin, plusieurs études ont également montré un fort taux d'expression de PD1 à la surface des cellules B sécrétant de l'IL-10, notamment dans des contextes d'hypersensibilité et d'infection à *Helicobacter* ^{207,208,236}.

Chez l'homme, une étude a montré une augmentation importante de la proportion de lymphocytes B CD5⁺CD1d^{hi}IgD^{hi} en cas de leishmaniose viscérale. Dans cette pathologie, la réponse immunitaire Th1 censée contrôler les parasites intracellulaires est affaiblie par la présence d'IL-10 et l'épuisement des lymphocytes T médiée par PD1. Ces lymphocytes B IgD^{hi} sont capables de synthétiser de l'IL-10 spontanément, mais également d'induire la production d'IL-10 par les lymphocytes T effecteurs et les autres lymphocytes B. Leur mécanisme d'action pourrait être dépendant de PD-L1 puisque son blocage spécifique sur les lymphocytes B restaure la réponse Th1²⁴³. Une deuxième étude, chez des patients présentant un hépatocarcinome à un stade avancé, identifie une sous-population de lymphocytes B tumorigènes, exprimant constitutivement des taux importants de PD1 et représentant environ 10% des lymphocytes B. Ces lymphocytes B montrent un phénotype CD5^{hi}CD24^{+/+}CD27⁺CD38^{low} distinct des B10 humains classiques CD24^{hi}CD38^{hi} périphériques. L'activation de la voie PD1 entraîne l'acquisition des fonctions régulatrices et tumorigènes de ces lymphocytes B, dépendantes de l'IL-10²⁴⁴. Les Bregs exprimant PD-L1 ont également été observés chez des patients VIH+²⁴⁵ et des patientes atteintes de cancer du sein²⁴⁶.

Induction de l'apoptose

Dans plusieurs modèles murins de diabète auto-immun, le transfert de lymphocytes B activés *ex vivo* par LPS ou séquences d'ADN CpG à des souris NOD pré-diabétiques empêche le développement du diabète en inhibant la réponse Th1 dirigée contre les cellules β pancréatiques et en entraînant l'apoptose des lymphocytes T autoréactifs *ex vivo*^{218,247}. En effet, ces lymphocytes B expriment le ligand du récepteur de mort cellulaire Fas. Ce mécanisme régulateur semble indépendant de l'IL-10 puisque ces Bregs ne produisent pas d'IL-10 et que le blocage du récepteur à l'IL-10 chez les souris NOD n'empêche pas l'effet immunosuppresseur des lymphocytes B sur les lymphocytes T effecteurs. Néanmoins, des lymphocytes CD5⁺CD1d^{hi} FasL⁺ pro-apoptotiques ou inhibant la prolifération des T CD4 *ex vivo* ont été décrits dans divers contextes expérimentaux d'arthrites auto-immunes²⁴⁸ et d'allergie^{249,250}. Chez l'homme, l'expression de FasL à la surface des lymphocytes B périphériques est augmentée chez les patients atteints de filariose, et corrélée à la quantité de lymphocytes T périphériques apoptotiques²⁵¹.

c) Développement des lymphocytes B régulateurs

Les mécanismes contrôlant *in vivo* l'induction et l'acquisition des fonctions régulatrices des lymphocytes B régulateurs chez l'homme et la souris sont encore peu élucidés, mais quelques données commencent à apparaître dans la littérature, notamment pour les lymphocytes B10 qui sont les plus étudiés.

Lymphocytes B synthétisant de l'IL-10

• MECANISMES D'INDUCTION

Dès la naissance il existe des lymphocytes B10 $CD1d^{hi}CD5^{+}$ et leurs progéniteurs « proB10 », mais on observe une augmentation de cette population lymphocytaire tout au long de la vie (**Fig.27**). Chez la souris, les proB10 présentent un phénotype $CD1d^{-}CD5^{-}$ dans le sang périphérique et les ganglions lymphatiques des sujets adultes, et un phénotype $CD1d^{-}CD5^{+}$ dans la cavité péritonéale des adultes ainsi que la rate des nouveau-nés. Chez l'homme, les proB10 sont retrouvés dans le sang des nouveau-nés et des adultes et expriment déjà le CD27 et le CD24 caractéristiques des B10 humains. La culture de lymphocytes proB10 et B10 sans stimulus n'entraîne pas l'expression d'IL-10. Ainsi, les précurseurs des B10 sont programmés pour la synthèse d'IL-10, mais doivent être d'abord activés avant de devenir compétents.

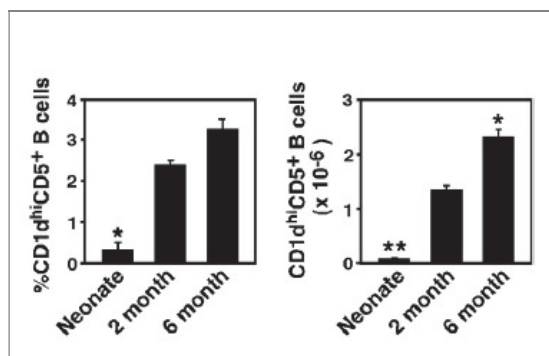


Figure 27. Proportion et nombre de B10 dans la rate en fonction de l'âge des souris ²⁵²

Certaines données semblent suggérer que **le développement des B10 à partir des proB10 serait indépendant des lymphocytes T**. En effet, chez des souris nudes présentant un déficit profond en lymphocytes T, le nombre de B10 spléniques n'est pas diminué par rapport aux souris normales ²⁵². Corroborant cette hypothèse, plusieurs études *in vivo* à partir de souris déficientes en CMH de classe I ou II ou en CD40 montrent que l'expression de ces molécules ne paraît pas impliquée dans la genèse des B10 ^{252,253}. En revanche *ex vivo*, la liaison du CD40 peut être utilisée pour activer la maturation des précurseurs des B10 et induire l'expression intracytoplasmique d'IL-10 mais elle ne permet pas sa sécrétion ultérieure. Ainsi, la coopération avec les lymphocytes T pourrait faciliter la maturation des proB10 dans certaines conditions, mais n'est pas indispensable à l'acquisition de leur capacité de synthèse d'IL-10 *in vivo* ²⁵².

Le développement des B10 serait donc plutôt induit par des signaux externes directement liés à l'inflammation ou au processus infectieux. Dans ce sens, la **stimulation antigénique du BCR semble fondamentale au développement précoce des Bregs synthétisant l'IL-10**. En effet, des souris transgéniques possédant un BCR fixe, sans diversité, voient leur proportion de B10 spléniques diminuer de 90% ²⁵². Le déficit en molécule du co-BCR CD19 engendre le même effet, alors que celui en CD22, régulateur négatif du BCR, entraîne une augmentation du nombre de B10 spléniques

^{193,252,254}. Dans ce contexte, des données montrent que **l'induction des B10 serait un phénomène spécifique de l'antigène**. Le transfert de B10 spléniques purifiés de souris sensibilisées au 2,4-dinitrofluorobenzène chez des souris déficientes en lymphocytes B et sensibilisées à l'oxazolone n'entraîne aucun effet protecteur dans ce modèle d'hypersensibilité de contact ¹⁹³. L'activation de splénocytes arthritogènes par du collagène induit l'apparition de B10 capables de prévenir l'arthrite auto-immune *in vivo* ¹⁹⁴, et dans un modèle d'EAE, la déplétion en lymphocytes B induit une prolifération et une accumulation préférentielle des lymphocytes T encéphalitogènes au niveau du système nerveux central ²⁵⁵. Enfin, *ex vivo*, la stimulation de proB10 par un anticorps anti-IgM mitogène non-spécifique induit très peu l'expression d'IL-10 par les lymphocytes B naïfs ^{252,256}.

Contrairement à cette première hypothèse, certaines données sont plutôt en faveur d'une **induction des B10 indépendante de l'antigène**. En effet, le transfert de lymphocytes B activés par LPS prévient le développement de diabète chez des souris NOD ²¹⁸ et celui de lymphocytes B activés par CpG prévient le développement de lupus chez des souris MRL/*lpr* ²⁵⁷. Dans ce sens, plusieurs études ont montré que **l'implication des TLR est primordiale dans la genèse des B10**. *In vivo*, dans des modèles murins d'EAE et d'infection à *Salmonella*, le déficit en TLR2, TLR4 ou MyD88, une protéine majeure de la voie de signalisation des TLR, est associé à une exacerbation des symptômes cliniques et une diminution de la survie des souris respectivement ^{210,252,256,258}. *Ex vivo* la stimulation de lymphocytes B naïfs via le **TLR2, 4 ou 9** engendre également la production d'IL-10 ^{256,259,260}. Dans ce contexte, le LPS semble particulièrement important au développement des B10. Il est le plus fort inducteur de l'expression intracytoplasmique d'IL-10 par les proB10 spléniques *ex vivo*, et permet également sa sécrétion, contrairement à la liaison du CD40 ²⁵². Il pourrait également engendrer la formation de B10 à partir de progéniteurs B CD1d^{low}CD5⁻ du sang et des ganglions lymphatiques. Il est à noter que l'ajout d'un anti-IgM mitogène non-spécifique sur des B10 préalablement activés par LPS ou anti-CD40 inhibe leur sécrétion d'IL-10 *ex vivo* ²⁵². Ainsi, une forte activation du BCR pourrait réguler l'induction des Bregs médiée par les signaux des TLR. Seuls les antigènes de faible spécificité pour le BCR entraîneraient le développement de Bregs. On peut imaginer que ce mécanisme empêche le développement d'une immunodépression non désirée en cas d'infection spécifique devant être éliminée par les réponses immunitaires effectrices.

En parallèle de l'activation du BCR et des TLR, **différentes cytokines** pourraient participer au développement des Bregs synthétisant de l'IL-10 en tant que signaux externes produits lors de l'inflammation ou du processus infectieux. Premièrement, **BAFF** induit la production d'IL-10 et d'IL-35 *ex vivo* par les lymphocytes B10 dérivant de la zone marginale. *In vivo*, le traitement par BAFF augmente le nombre de B10 dans la rate, et le transfert de lymphocytes B10 induits par BAFF prévient le développement d'arthrite auto-immune chez la souris ²⁶¹. Il entraîne également la production d'IL-35 par les lymphocytes B10 CD5⁺CD1d^{hi}FcγRIIb^{hi} de souris lupiques, alors qu'un

traitement anti-BAFF diminue la proportion de ces Bregs. Cette induction des Bregs IL-35⁺ par BAFF nécessiterait son interaction avec TACI et l'activation de la voie NF-κB1²⁶². Ensuite, l'**IL-35** elle-même peut entraîner la formation de Bregs²⁶³. Le traitement de souris par de l'IL-35 dans un modèle d'uvéite auto-immune entraîne la formation de lymphocytes B protecteurs synthétisant de l'IL-10 et de l'IL-35, qui inhibent les lymphocytes Th17 et Th1 et induisent l'expansion des lymphocytes Tregs. *Ex vivo*, l'IL-35 induit également la différenciation des lymphocytes B humains issus de donneurs sains en lymphocytes Bregs IL-10⁺ au détriment des lymphocytes B conventionnels²¹³. Par ailleurs, dans un modèle murin d'inflammation chronique de l'intestin, l'injection d'**IL-33** empêche le développement d'une colite chez les souris en induisant la différenciation d'une population de Bregs CD25⁺CD1d^{hi}IgM^{hi}CD5⁻CD23⁻Tim-1⁻ produisant de l'IL-10²⁶⁴. Les cytokines inflammatoires pourraient être impliquées dans le développement des B10 puisqu'*in vivo*, les souris d'un modèle murin d'arthrite auto-immune avec un déficit en récepteur à l'**IL-6** ou l'**IL-1β** présentent une diminution de Bregs et de leur production d'IL-10, ainsi qu'une symptomatologie exacerbée. De plus, une modification du microbiote intestinal modifie la synthèse d'IL-1β et IL-6 et impacte la différenciation de Bregs dans la rate et les ganglions mésentériques²⁶⁵. En revanche *ex vivo*, la culture dans un milieu contenant de l'IL-6 de lymphocytes B spléniques pendant 48 ou 72h puis stimulés de façon appropriée notamment par LPS n'augmente pas le nombre de B10 ni leur sécrétion d'IL-10²⁵³. Enfin, il est à noter que l'**IL-10** elle-même ne paraît pas avoir de rôle dans le développement des B10^{253,259}.

A partir de ces données, un protocole d'induction *ex vivo* des B10 a été défini et est majoritairement utilisé dans les études portant sur cette population lymphocytaire. Il est composé de deux étapes successives : (i) activation des proB10 et B10 par LPS ou anti-CD40 agoniste pendant 48h ; (ii) induction de la sécrétion d'IL-10 par LPS + Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + ionomycin (+ momensine ou bréfeldine A) pendant 5h^{193,252}. Les différents signaux induisant le développement des Bregs *in vivo* et *ex vivo* sont résumés sur la **figure 28**.

- **ACQUISITION DES FONCTIONS EFFECTRICES**

Ainsi, le développement des Bregs serait un mécanisme thymo-indépendant et pourrait faire partie d'un circuit de contre-régulation mis en place lors de certaines situations inflammatoires ou stimulant l'immunité. Néanmoins, **la coopération des lymphocytes T et des Bregs synthétisant de l'IL-10 paraît nécessaire, non au développement de ces derniers, mais à l'acquisition de leurs fonctions régulatrices**. En effet, *ex vivo*, la culture de lymphocytes B spléniques pendant 48h avec de l'**IL-21** entraîne leur sécrétion spontanée d'IL-10. *In vivo*, chez des souris Cd19^{-/-} d'un modèle d'EAE présentant un déficit en B10 et donc une forme sévère de la pathologie, le transfert de lymphocytes B CD1d^{hi}CD5⁺ Il10^{-/-} ou Il21R^{-/-} n'améliore pas les symptômes. Ces observations corroborent l'implication de l'IL-21 dans l'acquisition de la fonctionnalité régulatrice des B10. Or, les lymphocytes

T CD4 sont une source majeure de cette cytokine. En complément de ce facteur soluble, la coopération avec les lymphocytes T paraît dépendre du **contact entre ces deux types cellulaires**. En effet, le transfert de B10 déficients en CMH-II ou CD40 n'améliore pas la sévérité du précédent modèle. De plus, les B10 $IL21R^{-/-}$, $CMH-II^{-/-}$ ou $CD40^{-/-}$ perdent leur capacité à inhiber *in vivo* la prolifération des lymphocytes T CD4 et leur sécrétion d'IFN γ et d'IL-17²⁵³. L'acquisition des fonctions régulatrices des B10 requiert donc l'expression d'IL-10 mais également l'activation de la voie de signalisation du récepteur de l'IL-21 et les interactions cellulaires avec les lymphocytes T via le CMH II et le CD40^{189,191,253}. Cette hypothèse de fonctions effectrices spécifiques de l'antigène est particulièrement pertinente dans les pathologies auto-immunes où l'induction de Bregs n'est pas accompagnée d'immunodépression généralisée. La voie de développement et d'activation des B10 déduite de l'ensemble de ces observations est récapitulée sur la **figure 28**.

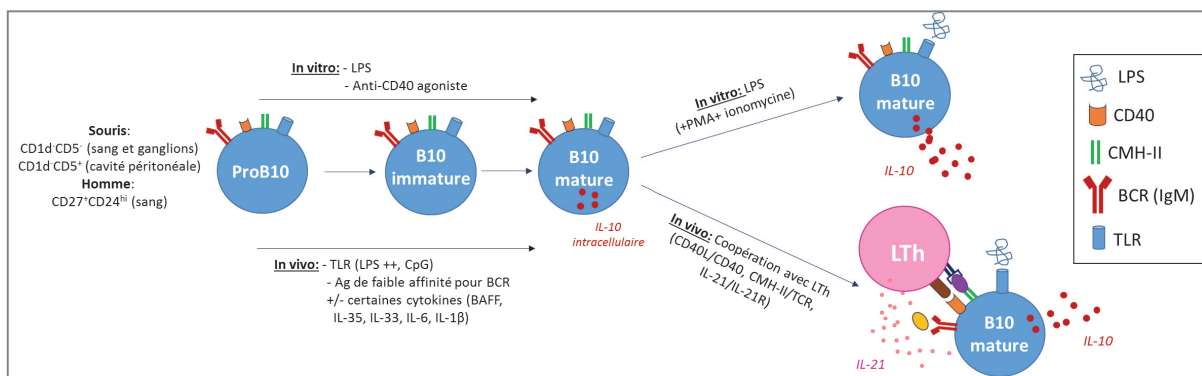


Figure 28. Développement et activation des fonctions effectrices des B10 (d'après²⁵³ et²⁶⁶)

Les B10 proviennent d'un progéniteur « proB10 ». L'étape d'induction des B10 est indépendante des lymphocytes T, et requiert *in vivo* une stimulation des TLR (LPS++) ou du BCR par un antigène de faible affinité. Ceci induit la maturation des proB10 en B10 compétents exprimant de l'IL-10 intracytoplasmique. L'étape d'activation est dépendante de la coopération avec les lymphocytes T et implique les interactions CD40/CD40L, CMH-II/TCR, IL-21/IL-21R. Ces signaux activent les fonctions effectrices des B10, c'est-à-dire la production d'IL-10. Les B10 sont alors capables d'inhiber via la synthèse d'IL10 les fonctions des lymphocytes T effecteurs.

Autres types de lymphocytes B régulateurs

La genèse des **lymphocytes B sécrétant du granzyme B** pourrait être induite suite à l'activation des TLR et du BCR, ou encore être sous l'influence de l'IL-21²³². Chez des patients VIH+ non traités, les lymphocytes T CD4 présentent une synthèse accrue d'IL-21 dépendante de Nef, mais expriment très peu CD40L. *Ex vivo*, ces lymphocytes T CD4 induisent la différenciation des lymphocytes B granzyme B⁺ CD5⁺CD43⁺CD86⁺CD147⁺, alors que l'addition de CD40L aux cocultures redirige les lymphocytes B vers une différenciation plasmocytaire²³¹. Ainsi, l'effet de l'IL-21 sur la différenciation des lymphocytes B paraît dépendre du contact cellulaire entre lymphocytes T et lymphocytes B via la voie CD40/CD40L. Dans l'infection à VIH, ce mécanisme pourrait contribuer aux altérations immunitaires et à l'inefficacité des réponses anticorps après vaccination décrites dans l'infection à VIH. Le rôle de la voie CD40/CD40L et de l'IL-21 dans le développement des lymphocytes

B granzyme B⁺ a également été montré dans des contextes de maladies auto-immunes, de cancers et de tolérance à la greffe, aussi bien dans des modèles murins que chez l'homme en clinique ^{232,267,268}.

Concernant les **lymphocytes B CD39⁺CD73⁺ synthétisant de l'adénosine** immunorégulatrice, leur prolifération et fonction seraient régulées de façon autocrine via les récepteurs à l'adénosine A₁R- and A_{2A}R ²²⁶.

Pour les **Bregs exprimant des checkpoints inhibiteurs**, un modèle murin de cancer du sein montre la capacité des MDSC à transformer les lymphocytes B conventionnels en Bregs PD-L1⁺ inhibant la réponse T ²⁶⁹. Par ailleurs, chez des patients atteints d'un cancer du pancréas, l'IL-18 induit la prolifération des lymphocytes B, leur expression d'IL-10 et de PD1, et diminue la cytotoxicité des lymphocytes T cytotoxiques et des NK. La combinaison d'un inhibiteur d'IL-18 et d'un anti-PD1/PD-L1 inhibe la croissance tumorale et le développement de métastases dans un modèle murin correspondant ²⁷⁰.

En ce qui concerne les **Bregs exprimant FasL**, une étude a montré que FasL est induit rapidement sur les B10 CD5⁺CD1d^{hi} *ex vivo* après activation de TLR4 par LPS. Au contraire, malgré une augmentation de l'expression d'IL-10, la stimulation du TLR9 par CpG associée ou non à un anti-CD40 n'engendre pas l'expression de FasL sur les B10. Des inhibiteurs de NF-κB and NF-AT diminuent l'activation de FasL médiée par TLR4 chez les B10 ²⁵⁰. La protéine BIP (binding immunoglobulin protein) induit également l'expression de FasL et PD-L1 sur les lymphocytes B spléniques ²⁷¹.

Pour les **Bregs synthétisant de l'IL-17**, leur développement est indépendant du BCR, du CD40 et des récepteurs dépendants de MyD88 tels que les TLR. Il ne requiert pas non plus les facteurs impliqués dans la différenciation des lymphocytes Th17 ou des cellules lymphoïdes innées, tels que l'IL-6, l'IL-23, RORγt et RORα. En revanche, les Bregs IL-17⁺ peuvent être induits *ex vivo* directement par des trypanostigotes de *Trypanosoma cruzi*, par l'intermédiaire d'une trans-sialidase du parasite qui modifie la glycosylation de molécules de surface des lymphocytes B ²²³.

Enfin, le développement des **lymphocytes B régulateurs TIM-1⁺** paraît être induit par la stimulation du BCR ²⁷². Le nombre de Bregs TIM-1⁺ et leur synthèse de cytokines sont également augmentés par la liaison d'un anticorps agoniste spécifique de TIM-1 et la synthèse autocrine d'IL-4 par les lymphocytes B. Ainsi, les signalisations du BCR et TIM-1 sont étroitement liées. Les ligands de TIM-1 restent à définir, mais les cellules apoptotiques pourraient jouer ce rôle ²⁷³. De ce fait, TIM-1 servirait aussi bien de marqueur de reconnaissance des Bregs synthétisant de l'IL-10 que de cible thérapeutique pour limiter ou induire leur développement ¹⁹⁹.

2) Les plasmocytes régulateurs

a) Mise en évidence des plasmocytes régulateurs dans les modèles précliniques

En 2010, Neves *et al.* étudient un modèle murin d'infection à *Salmonella typhimurium* et observent que les souris avec un déficit sélectif des lymphocytes B en IL-10 sont plus résistantes à l'infection, présentent un meilleur contrôle de la réplication bactérienne et une meilleure survie que les souris contrôles, mettant ainsi en évidence la présence de Bregs IL-10⁺. Ces Bregs apparaissent en 24h dans la rate après l'infection, avant la formation des centres germinatifs. Ils présentent un effet immunosuppresseur au bout de 2 jours, empêchant le recrutement de NK et PNN au niveau des sites infectés et diminuant la réponse lymphocytaire T CD4 et CD8 pro-inflammatoire. De façon étonnante, ces lymphocytes B expriment le CD138, marqueur de la lignée plasmocytaire.²⁵⁸ Ainsi, c'est la première fois que l'existence de plasmocytes régulateurs (Pregs) est évoquée.

Par la suite plusieurs équipes confirment la présence de plasmocytes régulateurs dans divers contextes. En 2012, Teichman *et al.* observent des plasmocytes régulateurs synthétisant de l'IL-10 dans un modèle murin de lupus érythémateux systémique. Ces plasmocytes sont caractérisés par la forte expression d'IRF4 et Blimp-1, marqueurs de différenciation plasmocytaire²⁷⁴. En 2013, Bermejo *et al.* observent des Bregs synthétisant de l'IL-17 dans l'infection à *Trypanosoma cruzi*. Ces cellules se situent dans les régions extrafolliculaires de la rate, sont dépourvus des marqueurs du centre germinatif mais expriment pour la plupart le CD138, mettant en évidence en réalité des plasmablastes/plasmocytes régulateurs²²³. De même, les Bregs spléniques produisant de l'IL-35 décrits par Shen *et al.* en 2014 dans les modèles de SEP et d'infection à *Salmonella typhimurium* sont exclusivement CD138⁺ et expriment également fortement IRF4 et Blimp-1, caractérisant une fois encore des plasmocytes régulateurs²¹⁰. Dans le modèle d'infection à *Salmonella*, très peu de plasmocytes présentent une transcription simultanée d'IL-10 et Ebi3, indiquant que des populations différentes de plasmocytes sont responsables de la synthèse d'IL-10 et IL-35²¹⁰.

En 2014, Matsumoto *et al.* sont les premiers à observer l'apparition de cellules B produisant de l'IL-10 *in vivo* après induction d'EAE dans un modèle expérimental murin. En effet, la synthèse d'IL-10 par les Bregs n'avait été jusqu'alors mise en évidence seulement qu'*ex vivo*. Ces cellules B présentent un phénotype CD138⁺CD44⁺ et sont présents majoritairement dans les ganglions lymphatiques mais sont rares dans la rate. Leur expression intermédiaire de Blimp-1 et une capacité de prolifération importante amènent les auteurs à considérer ces cellules comme des « plasmablastes » et non des plasmocytes matures. Au sein de ces plasmablastes certains expriment des IgM et d'autres des IgG, sans que les auteurs n'aient exploré à quelle population attribuer la synthèse d'IL-10²⁷⁵.

En 2015, Shalapour *et al.* s'intéressent au rôle des Bregs dans la chimiorésistance des cancer de la prostate ²⁷⁶. La déplétion génétique ou pharmacologique en lymphocytes B lève la chimiorésistance à l'oxiplatine. Le traitement par oxiplatine est associé à l'apparition d'une importante proportion de plasmocytes intra-tumoraux IgA⁺FasL⁺IL-10⁺PD-L1⁺, qui paraît médiée par la voie de signalisation du récepteur au TGF- β de type II. Grâce à la synthèse d'IL-10 et l'engagement de la voie PD-L1/PD1, ces plasmocytes régulateurs induisent l'épuisement cellulaire des lymphocytes T CD8 infiltrant la tumeur et inhibent leur réponse anti-tumorale cytotoxique. L'élimination de ces Bregs augmente l'éradication de la tumeur.

Enfin, en 2018 dans un modèle d'infection à *Salmonella*, Lino *et al.* montrent que la source principale d'IL-10 *in vivo* est une population de plasmocytes régulateurs caractérisés par l'expression de Lag-3. Cette population cellulaire synthétise beaucoup plus d'IL-10 *ex vivo* que les lymphocytes B10. Les plasmocytes Lag-3⁺ prolifèrent peu après infection, synthétisent majoritairement l'IgM et sont dépourvus de mémoire. Ils expriment KLF4 caractéristique des plasmocytes à longue durée de vie, les définissant ainsi comme des plasmocytes matures mais conservant la capacité de répondre aux stimuli externes. Leur nombre et leur expression d'IL-10 augmentent dans les 24 premières heures après l'infection puis se stabilisent. Leur proportion diminue ensuite du fait de l'expansion continue des autres sous-types de plasmocytes. Les plasmocytes Lag-3⁺ expriment également les checkpoints inhibiteurs CD200, PD-L1 et PD-L2. Leur propriété régulatrice provient de leur capacité à synthétiser de l'IL-10, comme le montre l'amélioration du contrôle de l'infection à *Salmonella* après injection d'anti-IL-10 et anti-récepteur à l'IL-10. Lag-3 paraît impliqué dans l'inhibition des autres populations plasmocytaires, mais son impact sur la réponse T n'a pas encore été exploré ²⁷⁷.

Il est à noter que l'activité régulatrice de ces différents types de plasmablastes/plasmocytes régulateurs pourrait aussi dépendre de la **sécrétion d'anticorps**, puisque dans un modèle murin de colite auto-immune, l'inhibition de la pathologie est corrélée à la synthèse d'IgM naturelles par les lymphocytes B-1 ²²⁰.

b) Mise en évidence des plasmocytes régulateurs en pathologie humaine

Chez l'homme, l'existence et le rôle de ces plasmocytes régulateurs est encore très peu étudié. Comme chez la souris, ils ont été retrouvés chez des patients atteints de **cancers de la prostate** ²⁷⁶. Un essai clinique chez des patients atteints de **sclérose en plaque** traités par une molécule visant à dépléter le pool de plasmocytes à courte et longue durée de vie, l'Atacicept, a montré une aggravation de la symptomatologie ²⁷⁸. Ceci pourrait être en faveur de la présence de plasmocytes régulateurs bénéfiques dans cette pathologie, et dont l'atacicept aurait engendré la déplétion. Les plasmocytes sont également observés dans les réactivation virales à **gammaherpes virus**, résidents dans les lymphocytes B et qui pourraient utiliser le fait que les plasmocytes sécrètent

des cytokines immunorégulatrices (notamment l'IL-10) pour inhiber les défenses antivirales de l'hôte ²⁷⁹. Enfin, il est à noter que les **IgG** peuvent présenter une activité catalytique immunosuppressive corrélée aux symptômes et évolution cliniques dans divers contextes cliniques comme les greffes rénales ou le sepsis sévère, ce qui peut apporter un argument supplémentaire en faveur de l'existence potentielle de plasmocytes régulateurs chez l'homme ^{280,281}.

c) Induction des plasmocytes régulateurs

La première hypothèse quant à l'induction des plasmocytes régulateurs est que **les différentes sous-populations de Bregs décrites ci-dessus pourraient se transformer rapidement en plasmablastes après activation**. En effet, au niveau transcriptionnel, le développement et l'acquisition des fonctions effectrices des Bregs sont associés à une augmentation de l'expression des facteurs Blimp-1 et IRF4, ainsi qu'à une diminution de l'expression de Pax5 et Bcl-6 ²⁶⁶. Or, les facteurs IRF4 et Blimp-1 sont principalement connus pour induire la différenciation plasmocytaire. IRF4 promeut par ailleurs la transcription d'IL-10 en se fixant dans la région promotrice du gène *Il-10*. L'implication de ces facteurs dans la genèse des cellules plasmocytaires régulatrices a d'ailleurs été confirmée dans un modèle d'EAE où les souris avec un déficit en *Irf4* ou *Prdm1* présentaient des symptômes neurologiques exacerbés. Au contraire, le déficit en *Bcl-6*, caractéristique des lymphocytes B du centre germinatif, n'avait aucun effet sur le nombre de plasmablastes régulateurs ni sur la sévérité de la pathologie, suggérant une génération des plasmablastes indépendante des réponses immunitaires du centre germinatif ²⁷⁵. De façon intéressante, les facteurs IRF4 et Blimp-1 sont également impliqués dans l'expression d'IL-10 et d'IL-35 par les lymphocytes Tregs ²⁸². Ceci suggère un module transcriptionnel commun contrôlant les activités immunosuppressives des Tregs et des Bregs.

L'induction *ex vivo* des plasmablastes synthétisant de l'IL-10 requiert des facteurs différents de ceux utilisés pour les Bregs, à savoir une association de CpG, IL-2, IL-6 et IFN α . Les plasmablastes ainsi induits expriment davantage d'IL-10 lorsqu'ils dérivent de l'activation de lymphocytes B naïfs que de lymphocytes B mémoires, corroborant l'hypothèse précédente. La limite à ce protocole d'induction *ex vivo* de plasmablastes IL-10⁺ est que leur fonction suppressive n'a pas été évaluée. Ces stimuli entraînent la sécrétion d'IgM par les plasmablastes, mais la sécrétion des autres isotypes d'immunoglobuline n'a pas été testée. Les B10, les Bregs provenant des T2-MZP chez la souris ainsi que les Bregs CD24^{hi}CD38^{hi} humains expriment tous de forts taux d'IgM, représentants de potentiels précurseurs de ces plasmablastes régulateurs IgM⁺.

L'étude de Matsumoto *et al.* vient compléter cette hypothèse. Ils décrivent des plasmablastes régulateurs se développant et acquérant leur fonction dans les ganglions lymphatiques ²⁷⁵. En effet, la splénectomie n'augmente pas la sévérité du modèle d'EAE et n'a aucun

impact sur le développement des plasmablastes dans les ganglions lymphatiques. Au contraire, chez les souris présentant un déficit spécifique des lymphocytes B en CD62L permettant l'entrée des cellules dans le ganglion, les souris sont incapables de contrôler l'EAE. Or, le déficit en cellules de la lignée B touche les ganglions mais pas la rate dans cette expérience. Ces résultats sont en désaccord avec la majorité des études citées dans les paragraphes précédents qui décrivent la présence de Bregs dans la rate et dont le transfert confère une protection dans de nombreux modèles murins de pathologies auto-immunes. Il faut rappeler que l'étude de Matsumoto *et al.* identifie les cellules B exprimant l'IL-10 *in vivo*, grâce au gène rapporteur de la GFP, alors que les autres études observent cette synthèse d'IL-10 *ex vivo*, après activation des lymphocytes B isolés de la rate. Ainsi, il est supposé que **l'effet protecteur du transfert des lymphocytes B spléniques activés *ex vivo* serait le résultat de leur migration dans les ganglions une fois réintroduits *in vivo* et de leur différenciation en plasmablastes. Les Bregs seraient ainsi programmés pour une fonction régulatrice dès les stades précoces de développement, mais deviendraient fonctionnels et atteindraient leur plein potentiel régulateur seulement après activation et différenciation en plasmablastes.** Ces plasmablastes pourraient ensuite retourner vers la rate, expliquant leur observation dans certaines études.

Néanmoins, l'identification de plasmocytes régulateurs dans la rate par Shen *et al.* ajoute de la complexité à ce modèle ²¹⁰. Dans cette étude, des sous-populations distinctes de plasmocytes spléniques synthétisent de l'IL-10 et de l'IL-35, sans co-expression de ces deux cytokines par les mêmes cellules. L'expression de ces cytokines est maximale dans la sous-population de plasmocytes la plus mature, CD138^{hi}CD22⁻, et très peu présente dans les formes plus naïves CD138^{int} CD22⁺, contrairement aux observations de Matsumoto *et al.*. En revanche, comme dans le modèle précédent, les plasmocytes spléniques stimulés *ex vivo* synthétisent uniquement de l'IL-10 ou IL-35, et pas d'IL-6, contrairement aux lymphocytes B CD1d^{hi} IL-10⁺, corroborant le potentiel régulateur supérieur des plasmocytes par rapport aux autres populations de cellules Bregs.

Ainsi, en croisant les résultats des deux études, il est possible d'envisager deux théories de développement des plasmocytes régulateurs, l'un et/ou l'autre se déroulant probablement en fonction de la population de Bregs impliquée et des stimuli de l'environnement. **La première théorie** (basée sur les observations de Matsumoto *et al.*) **est que les B10 seraient activés dans la rate et synthétiseraient de façon transitoire de l'IL-10 pour un effet immunomodulateur précoce. Puis certains Bregs quitteraient la rate pour se différencier en plasmablastes régulateurs IgM⁺ au niveau des ganglions, et synthétiser de grandes quantités d'IL-10 lors d'une deuxième vague de régulation. Alternativement, certains Bregs pourraient se différencier directement dans les ganglions en plasmablastes régulateurs, capables ensuite de recirculer.** **La deuxième théorie** (basée sur les observations de Shen *et al.*) **est que les Bregs demeurerait au niveau de la rate, et que certains**

s'orienteraient vers une différenciation en plasmablastes puis plasmocytes matures, associée à une augmentation progressive de la fonction régulatrice liée à la synthèse d'IL-10 ou d'IL-35. Il n'est pas encore déterminé si dans les deux cas, les plasmablastes ou plasmocytes régulateurs puissent subir la commutation de classe, se différencier en plasmocytes à longue durée de vie et persister après la résolution de l'inflammation (**Fig.29**).

Enfin, une troisième théorie (**Fig.29**) sur le développement des plasmocytes régulateurs provient des données récentes de Lino *et al.* identifiant des **plasmocytes régulateurs Lag-3⁺ dits « naturels »**²⁷⁷. En effet, ces plasmocytes sont présents chez les souris non infectées dans la rate, la moelle osseuse et les ganglions mésentériques. Leur nombre et leur expression d'IL-10 augmentent pendant les 24 premières heures après l'infection par *Salmonella*. Leur développement n'est pas dépendant du microbiote, mais ils seraient sélectionnés par des antigènes du soi, non encore identifiés mais probablement provenant de cellules endommagées. Cette hypothèse est corroborée par la propriété des IgM naturelles à reconnaître les cellules sénescents et apoptotiques. Par ailleurs, ces plasmocytes Lag-3⁺ présentent un épigénome unique au sein des plasmocytes, identique avant et 24h après l'infection par *Salmonella*, similaire à celui des lymphocytes B-1a. La majorité d'entre eux possèdent un BCR particulier, proche de celui des B-1a. Néanmoins, des cultures *ex vivo* ainsi que le transfert *in vivo* chez des souris Rag2^{-/-} de lymphocytes B-1a et B-1b issus de la cavité péritonéale et de lymphocytes B spléniques folliculaires et de la zone marginale montrent que plusieurs sous-populations de lymphocytes B peuvent donner naissance aux plasmocytes Lag-3⁺, sans limitation aux B-1a. Le développement des plasmocytes Lag-3⁺ paraît dépendre du BCR puisque leur nombre est diminué chez les souris déficientes en CD19 et augmenté en cas de déficit en CD72, co-récepteur inhibiteur du BCR. Ils sont en nombre normal chez les souris Myd88^{-/-}Trif^{-/-} et celles déficientes en CD40. Par ailleurs, ils expriment peu le CMH-II. Ainsi, les plasmocytes Lag-3⁺ peuvent se développer sans la coopération des lymphocytes T ni les signaux des voies TLR mais nécessitent un engagement du BCR. En ce qui concerne l'acquisition de l'expression d'IL-10, les plasmocytes Lag-3⁺ présentent un très faible taux de méthylation au niveau de la région du gène *Il10*, ainsi que des profils d'hypométhylations particuliers autour de ce gène. Ces caractéristiques indiquent un état de chromatine pré-programmé pour l'expression d'IL-10. L'induction d'IL-10 *in vivo* dans les plasmocytes Lag-3⁺ n'est pas dépendante du BCR ni du CD40, mais est induite par le LPS, donc par activation polyclonale via les signaux TLR. *Ex vivo*, l'expression d'IL-10 dans ces plasmocytes peut être induite par l'association d'anti-IgM, anti-CD40, IL-6 et IL-21. Ainsi **cette population de plasmocytes régulateurs naturels pourrait représenter une première ligne de régulation immunitaire en réponse aux signaux TLR, complétée par la suite par les autres populations régulatrices de lymphocytes B ou plasmocytes induites de façon plus antigène-spécifique.**

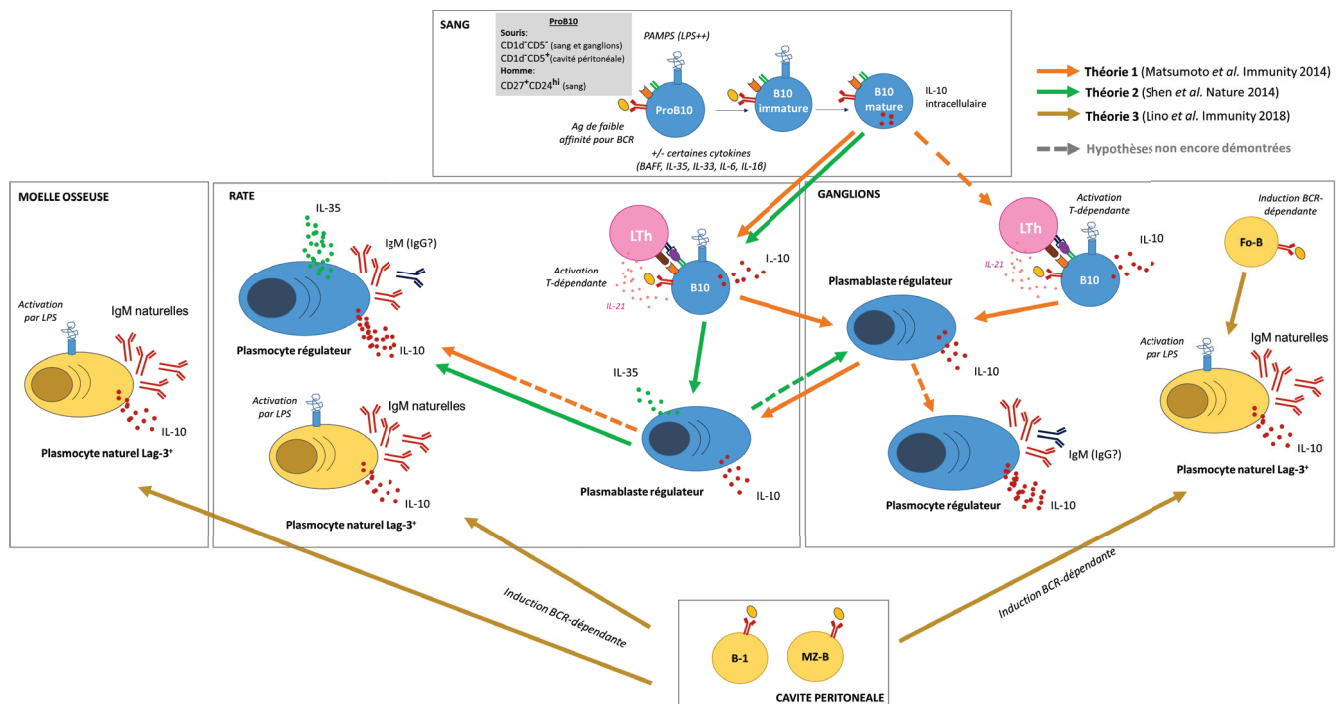


Figure 29. Théories du développement des plasmocytes régulateurs (d'après ^{210,275,283})
 Les trois théories décrites ci-dessus sont illustrées avec des couleurs de flèches différentes. Les flèches en pointillé représentent des hypothèses non encore démontrées.

3) Conclusion sur les cellules B régulatrices

On constate qu'il est difficile de relier la fonction immunorégulatrice à un phénotype particulier de lymphocytes B/plasmocytes. Les phénotypes de cellules B régulatrices jusqu'à présent décrits dans la littérature sont récapitulés dans le **tableau 7**. Dans ce contexte, la découverte d'un marqueur spécifique de ces cellules B régulatrices, tel que le facteur de transcription FoxP3 pour les lymphocytes Tregs, est primordiale. Ceci permettrait d'accélérer l'identification des cellules B régulatrices dans diverses pathologies et d'aider au design et suivi de thérapeutiques induisant ces cellules et la tolérance immune, ou au contraire les ciblant afin de stimuler la réponse immunitaire. De façon intéressante, il a été décrit une population de lymphocytes B exprimant FoxP3 chez l'homme. Dans le sang périphérique de sujets sains, ces lymphocytes B FoxP3⁺ étaient exclusivement retrouvés dans la population CD5⁺, suggérant une potentielle population régulatrice, sans qu'aucun test fonctionnel n'ait été utilisé ²⁸⁴. Par ailleurs, chez des patients présentant un lupus érythémateux systémique, les lymphocytes B CD25^{hi}FoxP3⁺ expriment l'IL-10 et leur proportion corrèle à l'activité de la maladie ²⁸⁵. Pour les plasmocytes régulateurs, l'expression du facteur de transcription IRF4 semble corrélée à la présence de Pregls dans plusieurs études ^{266,275,282}. Néanmoins, il ne représente pas encore le facteur de transcription spécifique tant recherché. En effet, en 2018 Zhang *et al.* étudient l'expression de ce marqueur chez des patients atteints de myasthénie ²⁸⁶. Dans cette pathologie auto-immune, les auto-anticorps sont directement pathogènes et ciblent les récepteurs

de l'acétylcholine, entraînant les symptômes neurologiques. Or, l'expression d'IRF4 paraît augmentée chez les patients présentant une myasthénie par rapport aux volontaires sains. Elle est de plus corrélée à la quantité de plasmocytes circulants, à la sévérité clinique et au taux d'auto-anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine. En réalité, il est plutôt probable qu'une combinaison de plusieurs marqueurs phénotypiques ou transcriptomiques permettra de **définir une signature caractéristique des cellules B régulatrices**. Des outils innovants d'analyse multidimensionnelle tels que la cytométrie de masse pourrait s'avérer utiles dans ce but.

Trop peu d'études sont encore disponibles pour statuer si les lymphocytes B et plasmocytes régulateurs représentent des populations à part entière dotées initialement de propriétés immunorégulatrices, ou s'ils acquièrent ces caractéristiques après différenciation dirigée par certains signaux spécifiques de la réponse immunitaire. Il est probable que les différentes populations B régulatrices et leurs mécanismes d'action s'entrecroisent afin d'entraîner une réponse suppressive efficace.

Tableau 7. Phénotypes particuliers associés aux cellules B régulatrices

	Mécanismes immunorégulateurs		Modèle murin	Homme
<u>Lymphocytes B régulateurs</u>	Sécrétion d'un facteur soluble	IL-10	- CD1d^{hi}CD5⁺ = « B10 » - CD1d^{hi}CD21^{hi}CD23^{hi}IgM^{hi} - TIM-1⁺ - CD11b⁺ - CD9 - Lymphocytes B-1a	- CD24^{hi}CD27⁺ - CD24^{hi}CD38^{hi}CD1d⁺
		IL-35		- CD19⁺EBI3⁺p35⁺ - CD19⁺ (ou CD20⁺) IL-35⁺
		TGF-β	CD35⁺ thrombospondine 1⁺	CD25^{hi}CD27^{hi}CD86^{hi}CD1d^{hi}
		IL-17	<i>Cf Pregs</i>	<i>Phénotype non détaillé</i>
		Adénosine	CD39^{hi} CD73⁺	CD39^{hi} CD73⁺
		Granzyme B		- CD5⁺CD43⁺CD86⁺CD147⁺IL-10⁻ - CD38⁺CD1d⁺IgM⁺CD147⁺IL-10⁺
	Induction des Tregs	Induction de FoxP3 et CTLA-4 Induction des Tr1	- GITRL⁺ - PD-L1⁺	CD25^{hi}CD27^{hi}CD86^{hi}CD1d^{hi}
	Checkpoints inhibiteurs	PD-L1 PD1	TACI⁺ BCMA⁺ BAFF-R⁺	- CD5⁺CD1d⁺IgD^{hi} - CD5^{hi}CD24⁺/CD27⁺CD38^{lo}
<u>Plasmocytes régulateurs</u>	Sécrétion d'un facteur soluble	Activation de la voie Fas/FasL	- FasL⁺ - CD5⁺CD1d^{hi}FasL⁺	CD19⁺FasL⁺
		IL-10	- CD138⁺ IRF4^{hi} BLIMP-1^{hi} = plasmocytes - CD138⁺CD44⁺ BLIMP-1^{int} = plasmablastes - CD138⁺IgA⁺FasL⁺ PD-L1⁺ - CD138⁺Lag-3⁺CD200⁺PD-L1⁺PD-L2⁺IgM⁺	CD138⁺IgA⁺ (cancer de la prostate)
		IL-17	CD138⁺/IgM⁺ GL7⁺ PNA⁺	
		IL-35	CD138⁺ IRF4^{hi} BLIMP-1^{hi}	
	Ig régulatrices		Lymphocytes B-1a	<i>Phénotype non détaillé</i>
	Checkpoints inhibiteurs	PD-L1	- CD138⁺IgA⁺FasL⁺PD-L1⁺ - CD138⁺Lag-3⁺CD200⁺PD-L1⁺PD-L2⁺IgM⁺	

C. Les lymphocytes B dans le sepsis

1) *Rôle protecteur des lymphocytes B vis-à-vis du sepsis*

a) *Rôle des lymphocytes B dans le sepsis*

Les lymphocytes B sont des acteurs clés de la prévention et la physiopathologie du sepsis. En effet, les souris Rag1^{-/-} ayant un déficit en lymphocytes T et B présentent une mortalité accrue suite à un sepsis induit par ligature et ponction caecale (CLP), ainsi qu'une diminution de production des cytokines IL-1 α et β , IL-6, IL-10, TNF, CCL5 et CCL2. Il en est de même pour les souris μ MT^{-/-} déficientes en lymphocytes B uniquement. En revanche, chez les souris TCR α / β ^{-/-} déficientes en lymphocytes T exclusivement, la mortalité et la synthèse de ces cytokines n'est pas modifiée par rapport aux souris contrôles. Le déficit en lymphocytes B chez les souris μ MT^{-/-} est également associé à une diminution de la clairance bactérienne. Le traitement des souris μ MT^{-/-} par du sérum de souris contrôles 2h avant l'induction du sepsis améliore leur survie, tout comme le transfert de lymphocytes B chez les souris Rag1^{-/-}. Ces données mettent en évidence le rôle des anticorps ainsi que des fonctions indépendantes des lymphocytes T dans la protection contre le sepsis ²⁸⁷.

Certaines sous-populations de lymphocytes B paraissent particulièrement impliquées dans le sepsis. La déplétion en IRA-B chez la souris septique est associée à un défaut de clairance bactérienne, qui engendre un orage cytokinique majoré et par la suite un choc septique. L'effet protecteur des IRA-B passe par leur capacité à synthétiser de grandes quantités d'IgM et de GM-CSF notamment dans la rate. Le GM-CSF stimule de façon autocrine la synthèse des IgM polyclonales opsonisantes, expliquant l'effet bénéfique des IRA-B au cours du sepsis. Toutefois, les IRA-B peuvent synthétiser de l'IL-3, qui active les monocytes et les PNN, sources de cytokines inflammatoires participant à l'orage cytokinique associé au sepsis. Ainsi ces IRA-B peuvent être à la fois protecteurs et délétères au cours du sepsis en fonction des cytokines qu'ils produisent ^{178,288}. Les lymphocytes B de la zone marginale sont également importants pour prévenir le sepsis. En effet, chez la souris, un déficit en récepteur Fc des IgM au niveau des lymphocytes B de la zone marginale entraîne une diminution de la proportion de cette population dans la rate ainsi qu'une altération de leur réponse au LPS et une diminution de leur synthèse d'anticorps dirigés contre les antigènes thymo-indépendants. Ceci a pour conséquence d'augmenter la susceptibilité des souris au sepsis ²⁸⁹. Du fait de leurs localisations, les MZ-B et les IRA-B sont en première ligne pour détecter les effractions des muqueuses et les pathogènes sanguins. Ainsi ils ont un rôle clé aussi bien dans la prévention que dans la réponse précoce au sepsis.

b) Facteurs prédictifs du risque de sepsis

Dans ce contexte, des études se sont intéressées à la valeur de certains paramètres lymphocytaires B pour prédire le développement du sepsis chez les patients à risque. Chez des patients hospitalisés pour traumatisme grave, une lymphopénie B apparaît 8 jours après le traumatisme, alors que l'expression du HLA-DR à la surface des lymphocytes B diminue après 48h. Cette diminution d'expression du HLA-DR n'est pas associée à la gravité du traumatisme initiale. En revanche, à partir de 6 jours après le traumatisme, elle devient significativement plus importante chez les patients développant ultérieurement un sepsis sévère par rapport à ceux qui n'en développent pas (**Fig.30**)²⁹⁰. Par ailleurs, chez des patients hospitalisés en réanimation, une étude récente a montré que les facteurs prédictifs indépendants du risque de développer un sepsis sont l'âge, la prise de traitements antibiotiques antérieure à l'hospitalisation en réanimation, la détection de bactéries multirésistantes chez le patient au moins une fois pendant le séjour en réanimation et un ratio des proportions de lymphocytes CD8 et CD19 mesuré 48h après l'admission en réanimation inférieur ou égal à 2²⁹¹. Enfin, le taux d'IgE totales sériques déterminé chez des patients avec un traumatisme majeur est significativement augmenté à l'admission par rapport à des volontaires sains, et est notamment plus élevé chez les patients ayant développé ultérieurement un sepsis. Ceci suggère un potentiel mécanisme dépendant des IgE dans l'activation des leucocytes impliqués dans le sepsis²⁹². Enfin, il est à noter que le répertoire des IgA sériques influencé par la composition de la flore commensale intestinale a un impact sur la susceptibilité au sepsis²⁹³.

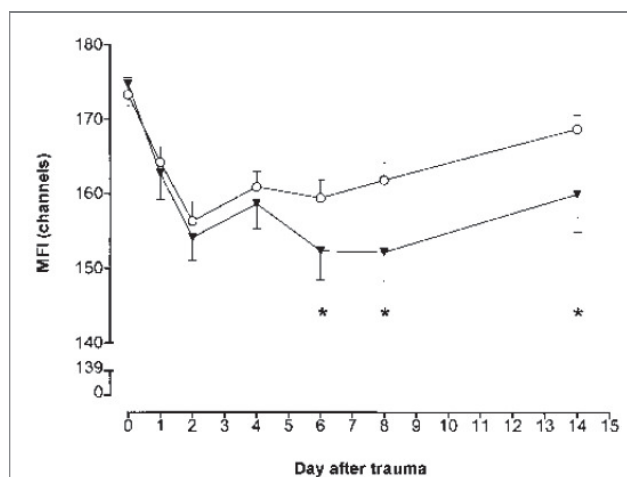


Figure 30. Comparaison de l'expression du HLA-DR à la surface des lymphocytes B chez des patients développant ou non un sepsis sévère en post-traumatisme²⁹⁰

Les triangles noirs représentent les patients développant un sepsis sévère post-traumatique alors que les ronds blancs sont ceux qui n'en développent pas. L'expression du HLA-DR à la surface des lymphocytes B est mesurée par cytométrie en flux et exprimée en moyenne de fluorescence (MFI). La première mesure a été réalisée 1 jour après le traumatisme.

2) Altérations des lymphocytes B au cours du sepsis

Le sepsis conduisant à des altérations immunitaires qui touchent à la fois les versants inné et adaptatif de la réponse immunitaire, et qui ont un impact sur les issues de la pathologie, certains auteurs se sont appliqués à décrire le statut des lymphocytes B au cours du sepsis.

a) Apoptose

Comme la majorité des autres populations leucocytaires, une déplétion importante du nombre de lymphocytes B lié à une **apoptose accrue** est observée après un choc septique ^{70,72,101}. Cette apoptose pourrait être liée à un phénomène d'activation importante des lymphocytes B, touchant particulièrement les sous-populations mémoires ²⁹⁴. La lymphopénie B est observée dès l'admission et persiste jusqu'à 28 jours après le choc septique ²⁹⁵. Une méta-analyse récente regroupant 992 patients septiques montre que la lymphopénie B à l'admission est significativement plus importante chez les patients non-survivants ²⁹⁶. Enfin, chez la souris septique, le nombre de lymphocytes B-1a CD5⁺ est diminué dès 5h après l'induction du sepsis, au niveau de la cavité péritonéale, de la rate et de la moelle osseuse. Ceci a pour conséquence une augmentation de l'inflammation au niveau de ces sites et de la mortalité. En effet, les B-1a produisent habituellement de grandes quantités d'IL-10, empêchant l'accumulation des PNN au niveau pulmonaire notamment, et diminuant leur sécrétion de cytokines inflammatoires délétères telles que l'IL-6, l'IL-1 β et MIP-2 et de myéloperoxydase ²⁹⁷.

b) Altérations phénotypiques

Par ailleurs, des modifications phénotypiques des lymphocytes B sont observées chez les patients septiques par rapport aux volontaires sains. En effet, la proportion de **lymphocytes B activés** CD19⁺CD69⁺ est augmentée chez l'ensemble des patients dès l'admission et jusqu'à 28 jours après le choc septique. A l'admission, les proportions de lymphocytes B exprimant la molécule de costimulation CD80 et la protéine de mort cellulaire Fas/CD95 sont retrouvées augmentées chez les non-survivants par rapport aux survivants ²⁹⁵. Dans les 3 premiers jours après un sepsis sévère, les patients présentent également une proportion augmentée de lymphocytes B CD21^{-/low}, suggérant la présence de **cellules épuisées** initialement décrites chez les patients VIH+ ^{298,299}. Une augmentation de l'expression de certains **checkpoints inhibiteurs** sur les lymphocytes B a également été observée au cours du sepsis. En effet, chez des patients septiques, dans les 12h après admission en réanimation, l'expression de PD1 et PD-L1 est augmentée sur l'ensemble des lymphocytes B par rapport aux volontaires sains, alors que PD-L2 est augmenté seulement sur les lymphocytes B mémoires. L'expression de PD1 est aussi plus importante sur les lymphocytes B mémoires que sur les B naïfs chez les patients septiques. L'expression de PD1 et PD-L1 ne paraît pas associée à la mortalité

ni au risque d'infection nosocomiale³⁰⁰. Chez la souris, l'expression de BTLA sur les lymphocytes B du sang et de la rate augmente également après induction d'un sepsis et est associée à une apoptose accrue des cellules B dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires¹³⁶. Par ailleurs, une **plasmocytose sanguine** a été reportée dans de rares cas de sepsis, chez des patients présentant une infection à *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*^{301,302}. Ce phénomène a été également décrit chez la souris, dans la rate de laquelle on assiste dès 24h après le sepsis à une importante déplétion des lymphocytes B de la zone marginale et folliculaires, mais à une activation des lymphocytes B résiduels. Cette activation conduit dans la première semaine suivant le sepsis à une augmentation importante des lymphocytes B B220⁺GL7⁺IgD^{lo} du centre germinatif et des cellules plasmocytaires CD138⁺IgD^{-/lo}²⁸⁷.

c) Altérations fonctionnelles

Enfin, il existe probablement des altérations fonctionnelles des lymphocytes B liées au sepsis, comme le suggère l'**hypogammaglobulinémie** observée chez les patients dans les premiers jours après le sepsis. Ceci est associé *ex vivo* à un défaut de sécrétion d'IgM par les lymphocytes B stimulés par CpG. Un lien entre cette altération fonctionnelle et la mortalité a été plusieurs fois suggéré, notamment dans une méta-analyse récente de 9 études regroupant 992 patients septiques et montrant un taux d'IgM circulantes significativement abaissé chez les patients non survivants. Ce lien reste néanmoins encore controversé^{296,298,303,304}. Pour compléter ces observations, il a été montré chez la souris une augmentation de la réponse B mémoire globale deux jours après l'induction du sepsis par CLP, mais une altération profonde de la réponse anticorps spécifique de l'antigène. Le transfert de cellules naïves T CD4, B ou cellules dendritiques ne corrige pas ce défaut³⁰⁵.

d) Lymphocytes B régulateurs

De façon intéressante, certaines données suggèrent par ailleurs un rôle potentiel des lymphocytes B régulateurs dans la réponse inflammatoire du sepsis. En effet, chez l'homme, Monserrat *et al.* ont observé une diminution de la proportion de lymphocytes B « régulateurs » CD19⁺CD23⁺ circulants parmi les B totaux pendant la première semaine après le choc septique chez les patients non-survivants par rapport à des volontaires sains. Au contraire, la proportion de cette population est augmentée jusqu'à 14 jours après l'admission en réanimation chez les patients survivants²⁹⁵. Les auteurs ne démontrent toutefois pas les propriétés immunorégulatrices de cette population cellulaire. Chez les nouveau-nés présentant un sepsis, la proportion de lymphocytes B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} circulants est significativement augmentée dans la première semaine suivant le sepsis. Leur capacité de synthèse d'IL-10 et d'inhibition des lymphocytes T CD4 naïfs est également accrue et associée à un pronostic favorable^{306,307}. Enfin, il a été montré un déficit en B-1a chez les

souris septiques, mais devant ces dernières données, il serait intéressant de comparer leur nombre entre les souris survivantes ou non. En effet, le transfert de B-1a à des souris septiques CD19^{-/-} atténue l'inflammation systémique et améliore la survie grâce à la sécrétion d'IL-10³⁰⁸.

En conclusion, le compartiment B et sa réponse anti-infectieuse sont altérés très tôt après un sepsis, aussi bien quantitativement que qualitativement. En parallèle, des lymphocytes B régulateurs pourraient apparaître précocement pendant le sepsis afin de limiter la réponse inflammatoire potentiellement délétère (**Fig.31**).

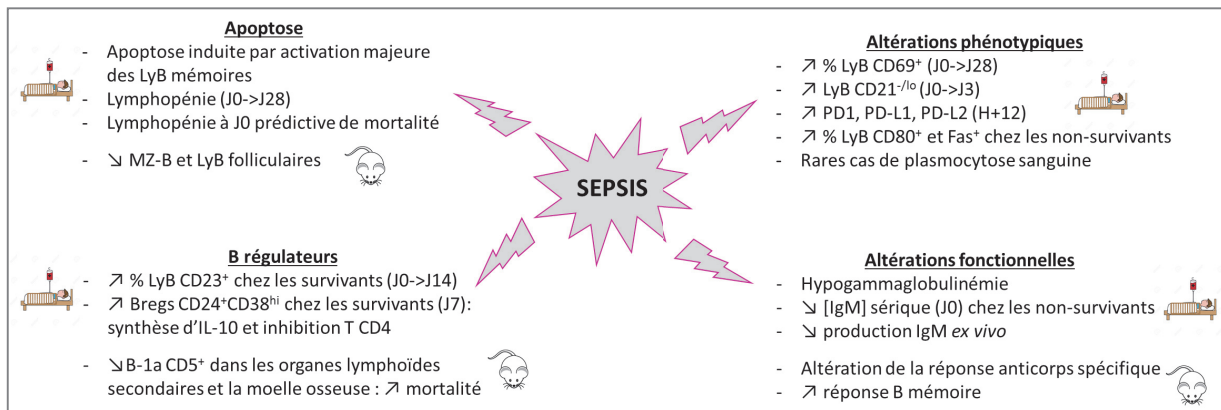


Figure 31. Conséquences du sepsis sur les caractéristiques des lymphocytes B

Résumé des données disponibles dans la littérature sur le statut des lymphocytes B lors d'un sepsis, dans des modèles expérimentaux murins ou chez les patients. LyB : lymphocyte B

IV. CONCLUSION

Du fait d'une incidence en constante augmentation et d'un taux de mortalité élevé, le sepsis est une priorité mondiale de santé. Il est maintenant reconnu que le sepsis associe une réaction hyper-inflammatoire délétère, prédominante dans la phase précoce, et des mécanismes régulateurs anti-inflammatoires, qui peuvent persister et induire une profonde immunodépression secondaire. L'ensemble des acteurs de la réponse immunitaire est affecté, engendrant un risque accru d'infections nosocomiales et de décès. L'utilisation de thérapeutiques immunostimulantes donnent des premiers résultats prometteurs (e.g. IL-7). Dans ce contexte, la caractérisation exhaustive des altérations immunitaires induites par le sepsis est primordiale. En effet, elle permettrait de révéler les cibles thérapeutiques les plus pertinentes, mais également d'identifier des biomarqueurs permettant l'individualisation des thérapeutiques, de suivre l'efficacité des traitements et de prédire les issues cliniques.

Malgré les avancées récentes dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis, le rôle et la caractérisation des lymphocytes B sont restés peu explorés. Pourtant, les lymphocytes B jouent un rôle clé dans la lutte anti-infectieuse et la réponse inflammatoire, grâce à leur capacité de présentation de l'antigène, de synthèse des cytokines pro-inflammatoires et de production des anticorps. Ils sont également capables de réguler cette réponse inflammatoire en inhibant les autres acteurs immunitaires. Les quelques données préexistantes focalisent principalement sur la phase précoce du sepsis. Elles montrent un rôle ambivalent des lymphocytes B, dû notamment à l'existence de plusieurs sous-populations ayant des effets différents lors du sepsis. En effet, les lymphocytes B sont nécessaires à l'élimination rapide du pathogène et la résolution de l'infection grâce aux sous-populations lymphocytaires B produisant des IgM polyréactives et des cytokines pro-inflammatoires au niveau des muqueuses et de la rate. En revanche, les lymphocytes B peuvent également aggraver la réaction hyper-inflammatoire délétère en participant au développement de l'orage cytokinique.

A part la lymphopénie B qui paraît persister plusieurs semaines après le sepsis, très peu de données sont disponibles sur le statut et le rôle des lymphocytes B dans la phase d'immunodépression post-septique. Très récemment, une étude a montré que des lymphocytes B synthétisant de l'IL-10 persistent jusqu'à 3,5 mois après l'induction du sepsis chez la souris³⁰⁹. Ainsi, des lymphocytes B régulateurs pourraient apparaître en réponse à l'hyper-inflammation du sepsis, dans le but d'en limiter la durée et les effets néfastes. En revanche, leur persistance pourrait contribuer à l'immunodépression induite par le sepsis et aux altérations immunitaires affectant les autres populations leucocytaires. A ce jour, il n'existe pas de données relative à ce sujet chez l'homme.

OBJECTIF ET PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

OBJECTIF ET PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

Mon travail de thèse vise à compléter la description des mécanismes contribuant à l'immunodépression des patients septiques. De manière plus spécifique, compte tenu des données parcellaires de la littérature, nous avons fait l'hypothèse que des lymphocytes B/plasmocytes pouvaient présenter des fonctions régulatrices et ainsi contribuer à l'établissement d'une immunodépression.

Ce travail s'inscrit dans un projet de recherche translationnelle. Il s'appuie d'une part sur l'étude d'une cohorte prospective observationnelle de patients en choc septique hospitalisés en service de réanimation à l'Hôpital Edouard Herriot. Cette étude de cohorte est en cours depuis plusieurs années au laboratoire (IMMUNOSEPSIS ; NCT02803346), approuvée par le CPP Sud-Est II et enregistrée au Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (#DC-2008-509) et à la CNIL. D'autre part, ce travail comporte la mise en place d'un modèle murin d'immunodépression post-septique dans le but d'explorer les mécanismes sous-jacents aux altérations décrites chez les patients.

Mon travail de thèse est constitué de trois articles :

- **Article 1** : Exploration du statut phénotypique et fonctionnel des cellules B au cours de la phase d'immunodépression induite chez des patients en choc septique (**J Immunol. 2018 Apr 1;200(7):2418-2425**)
- **Article 2** : Evaluation de la faisabilité et l'intérêt de l'utilisation de la cytométrie de masse pour caractériser les altérations immunitaires induites chez des patients en choc septique (**Sci Rep. 2018 Nov 23;8(1):17296**)
- **Article 3** : Rôle des plasmocytes régulateurs dans l'immunodépression induite par le sepsis (**article en préparation**)

Au sein de l'EA 7426 PI3, ce travail s'inscrit dans une thématique plus générale d'exploration des altérations immunitaires au cours du choc septique qui m'a permis de contribuer à différentes études et à la rédaction de différentes publications dont je suis co-auteur. Ces articles sont présentés en annexe de ce travail, par date de publication.

- **ANNEXE 1**: Monneret G, Gossez M, Aghaeepour N, Gaudillière B, Venet F. **How clinical Flow rebooted sepsis immunology. En révision à Cytometry Part A**
- **ANNEXE 2**: De Roquetaillade C, Monneret G, Gossez M, Venet F. **IL-7 and its beneficial role in sepsis-induced T lymphocyte dysfunctions. Crit Rev Immunol 2018 ;38(6):433–451 (in press).**

- ANNEXE 3: Alingrin J, Coiffard B, Textoris J, Nicolino-Brunet C, **Gossez M**, Jarrot PA, Dignat-George F, Monneret G, Thomas PA, Leone M, Reynaud-Gaubert M, Papazian L. **Sepsis is associated with lack of monocyte HLA-DR expression recovery without modulating T-cell reconstitution after lung transplantation.** Transpl Immunol. 2018 Dec;51:6-11.
- ANNEXE 4: Remy S, **Gossez M**, Belot A, Hayman J, Portefaix A, Venet F, Javouhey E, Monneret G. **Massive increase in monocyte HLA-DR expression can be used to discriminate between septic shock and hemophagocytic lymphohistiocytosis-induced shock.** Crit Care. 2018 Sep 11;22(1):213.
- ANNEXE 5: Remy S, Kolev-Descamp K, **Gossez M**, Venet F, Demaret J, Javouhey E, Monneret G. **Occurrence of marked sepsis-induced immunosuppression in paediatric septic shock.** Ann Intensive Care. 2018 Mar 13;8(1):36.
- ANNEXE 6: Letessier W, Demaret J, **Gossez M**, Allam C, Venet F, Rimmelé T, Monneret G. **Decreased intra-lymphocyte cytokines measurement in septic shock patients: A proof of concept study in whole blood.** Cytokine. 2018 Apr;104:78-84.
- ANNEXE 7: Zouiouich M, **Gossez M**, Venet F, Rimmelé T, Monneret G. **Automated bedside flow cytometer for mHLA-DR expression measurement: a comparison study with reference protocol.** Intensive Care Med Exp. 2017 Aug 30;5(1):39.
- ANNEXE 8: Monneret G, Demaret J, **Gossez M**, Reverdiau E, Malergue F, Rimmelé T, Venet F. **Novel approach in monocyte intracellular TNF measurement: Application to sepsis-induced immune alterations.** Shock. 2017 Mar;47(3):318-322.

RESULTATS

RESULTATS

ARTICLE 1 : CARACTERISATION DU STATUT DES LYMPHOCYTES B AU COURS DE L'IMMUNODEPRESSION INDUITE CHEZ LES PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE

(J Immunol. 2018 Apr 1;200(7):2418-2425)

A. Contexte et objectif

Alors que ces cellules jouent un rôle fondamental dans les réponses anti-infectieuses et inflammatoires, peu de données existent sur le statut et le rôle des lymphocytes B au cours du sepsis, et d'autant moins lors de la phase immunosuppressive du choc septique. ***Ainsi, l'objectif de cette première étude était de caractériser le statut fonctionnel et phénotypique des lymphocytes B au cours de la phase immunosuppressive chez des patients en choc septique.***

B. Description et principaux résultats de l'étude

Au total, 138 patients en choc septique ont été inclus dans cette étude ainsi que 48 volontaires sains (HV). Le phénotype des lymphocytes B circulants ainsi que leur fonction ont été caractérisés chez les patients à J1, J3 et J7 après le choc septique et comparés à des sujets sains.

Après le choc septique, les patients présentent une lymphopénie B mais une proportion conservée par rapport aux autres lymphocytes. Comme pour les monocytes, l'expression du HLA-DR à la surface des lymphocytes B est diminuée, suggérant une altération de la fonction de présentation antigénique. Ceci est associé à une proportion augmentée de lymphocytes CD19⁺CD21^{lo}CD95^{hi}, caractéristique de l'épuisement cellulaire des cellules B. Corroborant cette observation, au niveau fonctionnel, les lymphocytes B issus de patients septiques ont une capacité diminuée à s'activer et à proliférer après stimulation *ex vivo*. En revanche, ils produisent davantage d'IL-10 que les lymphocytes B issus de volontaires sains. Enfin, une plasmocytose sanguine importante apparaît après le choc septique.

C. Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que la phase d'immunodépression du choc septique est associée à une réponse B altérée, caractérisée par une lymphopénie et un état d'épuisement cellulaire. Par ailleurs, la synthèse d'IL-10 par les B stimulés suggère un potentiel profil immunorégulateur de certaines cellules B qui pourraient être des plasmocytes.



DIGITAL EDITION

Live-Cell Analysis Handbook

LEARN MORE >

A comprehensive guide to live-cell analysis inside the incubator

sartorius

IncuCyte
A Sartorius Brand



Septic Shock Shapes B Cell Response toward an Exhausted-like/Immunoregulatory Profile in Patients

This information is current as of April 4, 2018.

Claude-Alexandre Gustave, Morgane Gossez, Julie Demaret, Thomas Rimmelé, Alain Lepape, Christophe Malcus, Françoise Poitevin-Later, Laurent Jallades, Julien Textoris, Guillaume Monneret and Fabienne Venet

J Immunol 2018; 200:2418-2425; Prepublished online 19 February 2018;

doi: 10.4049/jimmunol.1700929

<http://www.jimmunol.org/content/200/7/2418>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2018/02/16/jimmunol.1700929.DCSupplemental>

References This article **cites 39 articles**, 9 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/200/7/2418.full#ref-list-1>

Why *The JI*? Submit online.

- **Rapid Reviews! 30 days*** from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

**average*

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/alerts>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2018 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Septic Shock Shapes B Cell Response toward an Exhausted-like/Immunoregulatory Profile in Patients

Claude-Alexandre Gustave,^{*,†,‡,1} Morgane Gossez,^{*,†,‡,1} Julie Demaret,^{*,†,‡}
 Thomas Rimmelé,^{†,‡,§} Alain Lepape,[¶] Christophe Malcus,^{*} Françoise Poitevin-Later,^{*}
 Laurent Jallades,^{||} Julien Textoris,^{†,‡,§} Guillaume Monneret,^{*,†,‡} and Fabienne Venet^{*,†,‡}

Septic shock is accompanied by the development of immune dysfunctions whose intensity and duration are associated with increased risk of secondary infections and mortality. Although B lymphocytes play a pivotal role in the immune response to infections, no comprehensive exploration of circulating B cell status has been performed during the immunosuppressive phase of septic shock. Thus, our aim was to extensively characterize the phenotype and function of B cells in septic shock, including IL-10 production. Circulating B lymphocyte phenotype and function were evaluated by flow cytometry on fresh whole blood and after ex vivo stimulation in adult septic shock patients sampled at day 1, 3, and 6 after the onset of shock. The circulating B cell number was reduced in septic shock patients, whereas the B cell proportion among total lymphocytes was increased. The remaining circulating B lymphocytes presented with decreased MHC class II expression and increased CD21^{low} CD95^{high} exhausted-like phenotype but showed no change in maturation status. Circulating B cell functions were markedly altered after sepsis with reduced ex vivo activation and proliferation capacities. Finally, B cell response after septic shock was characterized by a clear plasmacytosis and an increased IL-10 production in remaining B cells from patients after ex vivo stimulation. During the sepsis-induced immunosuppression phase, B cell response is altered and is oriented toward an exhausted-like/immunoregulatory profile. Further studies are now needed to confirm the immunoregulatory properties of B lymphocytes and evaluate their role in sepsis-induced immunosuppression. *The Journal of Immunology*, 2018, 200: 2418–2425.

Sepsis, defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection (1), represents a major healthcare challenge with high incidence and mortality (2, 3). In the United States, the number of cases of sepsis exceeds 750,000 per y and is still rising (2, 4). In a recent epidemiological study, septic shock, i.e., the subset of sepsis associated with acute circulatory failure, remained associated with a crude mortality of more than 45% (3). Last but not

least, sepsis is associated with a high economic burden due to long and costly hospital stays (4).

Septic shock leads to the development of immune dysfunctions evidenced by patients' inability to eradicate primary infection, propensity to acquire new secondary infections, and failure to respond to skin testing with recall Ags (5). Sepsis-induced immune alterations affect both innate and adaptive immune responses (5). The intensity and duration of these alterations are associated with increased risk of secondary infections and mortality, therefore identifying sepsis-induced immune alterations as a novel therapeutic target in this hitherto deadly disease (5).

B lymphocytes are multifunctional cells playing a pivotal role in both innate and adaptive immune responses. Although mostly known for their role in the humoral immune response through secretion of specific Igs, B lymphocytes are also presenting cells that can activate T cells (6) through MHC class II expression. The interaction of several bacterial products with B cells causes their activation and effector cytokine production (7). B cells can also gain immunoregulatory properties, affecting other cells of the immune system and subpopulations of regulatory B cells have been described previously (6–8).

Few studies have investigated B lymphocyte response after septic shock. Sepsis induction in B cell-deficient mice led to increased mortality but decreased cytokine production, whereas treatment of Rag1-deficient mice with B cells significantly improved sepsis survival (8, 9). In patients, several studies described the marked decrease in B cell numbers due to increased apoptosis (10–12). Also, studies showed that TLR stimulation can favor IL-10 production by B cells and have described several subpopulations of regulatory B lymphocytes (13). Nevertheless, no comprehensive exploration of B cell phenotype and function has yet been performed in septic shock. Thus, in this study we aimed to describe B cell status during sepsis-induced immunosuppression,

*Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, Edouard Herriot Hospital, 69437 Lyon, France; [†]EA 7426 Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression, PI3, Claude Bernard Lyon 1 University, bioMérieux, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, 69437 Lyon, France; [‡]Joint Research Unit, Claude Bernard Lyon 1 University, bioMérieux, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, 69437 Lyon, France; [§]Hospices Civils de Lyon, Anesthesia and Critical Care Medicine Department, Edouard Herriot Hospital, 69437 Lyon, France; [¶]Hospices Civils de Lyon, Intensive Care Unit, Lyon-Sud Hospital, 69310 Pierre-Bénite, France; and ^{||}Hospices Civils de Lyon, Hematology Laboratory, Lyon-Sud Hospital, 69310 Pierre-Bénite, France

¹C.-A.G. and M.G. contributed equally to this work.

ORCID: 0000-0002-4421-2983 (C.-A.G.); 0000-0002-3821-9337 (J.T.); 0000-0002-9961-5739 (G.M.); 0000-0003-0462-4235 (F.V.).

Received for publication June 28, 2017. Accepted for publication January 26, 2018.

This work was sponsored by funds from the Hospices Civils de Lyon (to G.M., F.V., A.L., and T.R.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Fabienne Venet, Immunology Laboratory, EA7426 Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression, PI3, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5, Place d'Arsonval, 69437 Lyon, Cedex 03, France. E-mail address: fabienne.venet@chu-lyon.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: AB/C, Ab bound per cell; EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; EFS, Etablissement Français du Sang; HV, healthy volunteer; ICU, intensive care unit; IQR, interquartile range; MFI, median fluorescence intensity; mHLA-DR, monocyte HLA-DR; PB, Pacific Blue; SSC, side scatter.

Copyright © 2018 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/18/\$35.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1700929

including exploration of IL-10 production, hypothesizing a potential orientation of the B cell response toward an immunoregulatory profile.

Materials and Methods

Study population

This clinical study was conducted on septic shock patients admitted to the intensive care unit (ICU) of the Centre Hospitalier Universitaire Lyon Sud and the Edouard Herriot Hospital (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France). This project is part of a global study on ICU-induced immune dysfunctions. It has been approved by the Institutional Review Board for ethics (Comité de Protection des Personnes Sud-Est II), which waived the need for written informed consent because this study was observational with low risk for the patients and no specific blood sampling procedure besides routine blood sampling was required (Institutional Review Board number 11236). This study is also registered at the French Ministry of Research and Teaching (DC-2008-509) and recorded at the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés. Oral information and nonopposition to inclusion in the study were mandatory and recorded in patients' clinical files. This study is registered at NCT02803346.

Septic shock patients were recruited from May 2012 to April 2015, thus identified according to the diagnostic criteria of the 1992 consensus definitions of the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine (14). To note, 52.9% of patients presented with serum lactate level at admission >2 mmol/l, corresponding to the actual Sepsis-3 definition (1). Exclusion criteria disqualified patients under 18 y of age and subjects with aplasia or pre-existent immunosuppression. Septic shock diagnosis required the combination of an identifiable site of infection with persisting hypotension—despite fluid resuscitation—and evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: 1) temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$; 2) heart rate >90 beats per min; 3) respiratory rate >20 breaths per min; 4) WBC count $>12,000$ per mm^3 or <4000 per mm^3 . The onset of septic shock was defined by the beginning of vasopressor therapy.

EDTA-anticoagulated tubes were collected in patients during a routine blood sampling procedure. Clinical and biological parameters were collected, including demographic characteristics, date and cause of admission to ICU, status at day 28 after inclusion, type of infection, and comorbidities allowing for the calculation of the Charlson comorbidity index (15). Severity scores were recorded: the Simplified Acute Physiology Score II (range 0–194) (16), the Sepsis-related Organ Failure Assessment (range 0–24) (17), and McCabe classification (range of the underlying disease severity: 0–3). On the whole cohort, HLA-DR expression on B cells and monocytes was evaluated as part of the routine immunomonitoring at day 1–2 (D1), day 3–4 (D3), and day 6–8 (D6) after the onset of shock. On a subgroup of patients from this main cohort, we studied B cell phenotype and functions using specific and more complex analyses performed on D3 samples to describe B cell status during the immunosuppressive phase after septic shock. Because of the technical difficulty in performing such experiments on fresh whole blood from patients, we were not able to perform these techniques on all the samples from one patient, and thus were unable to follow the evolution of these parameters over time. Finally, data were not censored if death occurred after the time-point analyzed.

Concomitantly, EDTA-anticoagulated tubes collected from healthy volunteers (HV) were obtained from the blood bank Etablissement Français du Sang (EFS) of Lyon. According to the EFS standardized procedures for blood donation, informed consent was obtained from healthy donors, and personal data were anonymized at the time of blood donation and before the transfer of blood to our research laboratory. Overall, 48 HV were included, 35.4% were male and the median [interquartile range (IQR)] age was 33 (28–45) y. Expression of B cell HLA-DR and monocyte HLA-DR (mHLA-DR) was measured on all 48 healthy donors. Other assays were performed on fewer HV samples.

Every experiment was performed on fresh whole blood collected the same day, either sampled from septic shock patients recruited in our clinical protocol or from healthy donors coming from the Lyon blood bank. Sample storage was systematically shorter than 3 h and each sample was kept on ice during storage. Within the same set of experiments, a single operator and a single reagent lot were used to generate results in patients and controls, thus enabling direct comparison between groups.

Flow cytometry

Whole blood was stained with Pacific Blue (PB)-labeled anti-CD4 Abs (Beckman Coulter). RBCs were lysed on automated TQ Prep (Beckman Coulter). CD4⁺ lymphocytes were first gated out of total cells on a

biparametric CD4/side scatter (SSC) dot-plot. Absolute numbers of CD4⁺ lymphocytes per microliter were then calculated thanks to calibration bead addition in the staining tube (FlowCount fluorospheres; Beckman Coulter).

HLA-DR expression was evaluated on monocytes and B cells as previously described (18). Briefly, whole blood was stained with Quantibrite HLA-DR/Monocyte mixture [Quantibrite anti-HLA-DR PE (clone L243)/Anti-monocytes (CD14) PerCP-Cy5.5 (clone MΦP9); Becton Dickinson, San Jose, CA] and PB-labeled anti-CD19-Ab (Beckman Coulter). Samples were then lysed using the FACS Lysing solution (Becton Dickinson). Monocytes were first gated out from other cells on the basis of labeling with PerCP-Cy5.5-CD14, whereas B cells were selected based on CD19 expression, and mHLA-DR expression was then measured on their surface (monoparametric histogram) as median fluorescence intensities (MFI) related to the entire cell population (as recommended by the manufacturer). These results were then transformed in Ab bound per cell (AB/C) thanks to calibrated PE-beads (BD Quantibrite PE Beads; Becton Dickinson).

Exhaustion and maturation markers were also measured on B cells from septic patients. Briefly whole blood was incubated with allophycocyanin-labeled anti-CD19, PE-labeled anti-CD21, and FITC-labeled anti-CD95 Abs (Beckman Coulter). B cells were selected based on a biparametric CD19/SSC dot-plot and the percentage of CD21^{low} CD95^{high} cells among total B cells [i.e., exhausted-like B cells (19)] was calculated.

Similarly, B cell maturation status was evaluated. Whole blood was incubated with PECy5-labeled anti-CD19, PE-labeled anti-IgD (Beckman Coulter), and FITC-labeled anti-CD27 (Becton Dickinson) Abs. B cells were selected based on a biparametric CD19/SSC dot-plot and the percentages of CD27⁺IgD⁺ (naïve), CD27⁺IgD⁺ (switched memory), and CD27⁺IgD⁺ (unswitched memory) B cells among total B cells were calculated (20).

Finally, plasma cell differentiation was evaluated through coexpression of CD38 and CD138 markers (21). Cells were incubated with allophycocyanin-labeled anti-CD19, PE-labeled anti-CD138 (Beckman Coulter), and FITC-labeled anti-CD38 (Becton Dickinson) Abs. B cells were selected based on a biparametric CD19/SSC dot-plot and percentage of CD38^{high}CD138^{high} cells among total B cells was calculated. For these last three protocols, RBCs were lysed using Versalys lysing reagent (Beckman Coulter).

Samples were run on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter) and a minimum of 1500 events was routinely recorded. Calibration beads (SPHERO Rainbow Calibration Particles; BD, and Flow-Check Fluorospheres; Beckman Coulter) were run daily to check for routine alignment, day-to-day, and long-term performance validation. Listmodes were subsequently analyzed using Kaluza software (Version 1.2; Beckman Coulter).

Cell purification and culture

In some experiments, PBMCs were purified using Ficoll gradient-centrifugation (Biochrom), numerated using Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter) and DNA marker LDS 751 (Molecular Probes). The percentage of B cells among total lymphocytes in PBMCs was also calculated by incubating cells with PB-labeled anti-CD19 Ab (Beckman Coulter). The absolute number of circulating B cells was then calculated by multiplying this percentage to the total number of lymphocytes per microliter, determined from whole blood on forward scatter/side scatter plot using Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter). Before cell culture, PBMC suspension was adjusted to 2×10^6 cells per ml in complete RPMI 1640 culture medium (Eurobio) supplemented with 10% human AB serum (EFS), and containing 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B (Life Technologies), 1000 IU/ml penicillin (Sigma-Aldrich), 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Sigma-Aldrich), and 200 mM L-glutamine (Lonza).

Activation and proliferation assays

PBMCs were stimulated at 37°C and 5% CO_2 with PHA (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Oxoid) or with PWM (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich) or left untreated (nonstimulated cells) during 24 h (activation experiment) or 72 h (proliferation experiment). For cell activation evaluation, after 24 h of cell culture, B cells were stained with PE-labeled anti-CD69 and PB-labeled anti-CD19 Abs (Beckman Coulter), and the MFI of CD69 on CD19⁺ cells was recorded. In parallel, cell proliferation was evaluated as previously described (22). Briefly, after 72 h of cell culture, AlexaFluor488-labeled 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) integration in newly synthesized DNA was detected using the click chemistry reaction as recommended by the manufacturer (Molecular Probes). Allophycocyanin-labeled anti-CD19 Ab (Beckman Coulter) was added and results were expressed as percentages of proliferating B cells (EdU positive) among total B cells. For both experiments, stainings were acquired on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter) and a minimum of 1500 events was routinely recorded.

Intracellular IL-10 production measurement

PBMCs were stimulated with either CpG (10 μ g/ml; InvivoGen) and recombinant human CD40L (1 μ g/ml; R&D Systems) or LPS (10 μ g/ml; Sigma-Aldrich) and CD40L (1 μ g/ml) or left unstimulated at 37°C and 5% CO₂ during 48 h. During the last 5 h of incubation, Golgi stop (4 μ l per well; Becton Dickinson), PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich), and ionomycin (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich) were added in cell culture wells (23, 24). Then the intracellular IL-10 concentration was evaluated through intracellular flow cytometry staining according to the manufacturer's protocol using a BD Fixation/Permeabilization kit (Becton Dickinson), allophycocyanin-labeled anti-CD19 (Beckman Coulter), and PE-labeled anti-IL-10 Abs or isotype control (Becton Dickinson). A minimum of 1500 events was routinely acquired on a Navios flow cytometer.

Cell purification and microscopic evaluation

After PBMC purification, cells were stained with PB-labeled anti-CD45 and PE-labeled anti-CD19 Abs (Beckman Coulter), and were sorted on a FACSARIA II (Becton Dickinson). After doublets and debris exclusion, lymphocytes were selected on a biparametric CD45/SSC dot-plot. Among selected CD45⁺ lymphocytes, subpopulations of lymphocytes were sorted based on CD19 expression levels (CD19^{neg}, CD19^{low}, and CD19^{high} lymphocytes). Cytospins of each of these cell-sorted populations were performed. After Giemsa staining, these microscope slides were analyzed by a histologist blind of cell sorting populations (Nikon Eclipse 80i microscope at 60 $\times$ magnification using a Basler camera and ICS Capture software; Tribvn, France).

Statistical analyses

Results are mostly presented as individual values and/or box plots in figures, and expressed as medians with first quartile to third quartile IQR within the text. In Fig. 1, age-matched reference values for standard lymphocyte immunophenotyping (i.e., circulating lymphocyte counting) from clinical laboratory are shown as open boxes representing 5th–95th percentile ranges and medians, whereas individual values from septic shock patients are plotted. In Supplemental Table I, values are presented as numbers of cases and related percentages for categorical variables and as medians with first quartile to third quartile IQR between brackets for continuous variables. Results of lymphocyte subpopulation counts from patients were compared with age-matched reference values provided by the clinical immunology laboratory of Edouard Herriot Hospital (25) using nonparametric Signed Rank Sum Test. Nonparametric Mann–Whitney *U* tests and Fisher exact tests were used to compare data between survivors and non-survivors or between septic shock patients and controls. Correlations between parameters were studied with the Spearman correlation test. Statistical analyses and graphics were developed with the use of R-Studio and GraphPad Prism 5 software.

Results

Patient demographics

In total, 138 septic shock patients were included. Their demographic data are presented in Supplemental Table I. Median (IQR) Simplified Acute Physiology Score II and Sepsis-related Organ Failure Assessment scores were 64 (50–77) and 11 (9–13) respectively. ICU-acquired infection was noted in 27 patients (19.6%) and 48 patients died within 28 d after the onset of shock (35% nonsurvivors). Septic shock patients were characterized by strong immunosuppression at day 3 after the onset of septic shock (D3) as illustrated by the marked decrease in mHLA-DR [3749 AB/C (1712–6282)] (26).

Sepsis-induced lymphopenia and decreased absolute B cell count after septic shock

At D3, septic shock patients presented with a significant decrease in total lymphocyte [median (IQR) 793 cells per μ l (519–1100)], CD4⁺ T cell [333 cells per μ l (191–539)] and B cell counts [144 cells per μ l (56–196)] compared with normal age-matched reference values from the clinical laboratory ($p < 0.005$; Signed Rank Sum Test, Fig. 1A). The percentage of B cells was increased in septic patients [16% (8–22) in patients; $p < 0.005$; Signed Rank Sum Test, Fig. 1B] showing that a depletion of circulating B cells

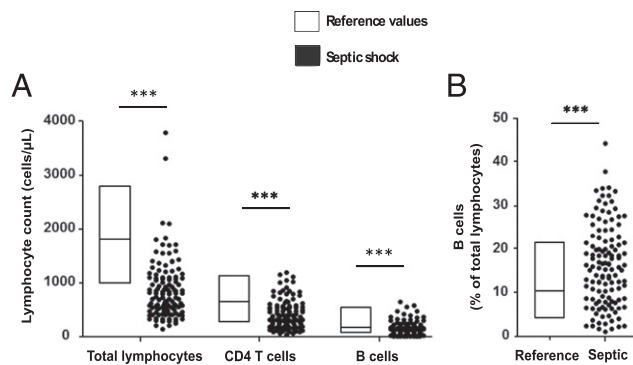


FIGURE 1. B cell count is decreased after septic shock whereas percentage of B cells is increased. Circulating total and CD4⁺ T lymphocyte counts (**A**) and B cell percentages among total lymphocytes (**B**) were evaluated at day 3 in septic shock patients. Individual values ($n = 138$) are plotted for patients along with open boxes depicting age-matched reference values from routine clinical laboratory. These reference values are presented as medians and 5th–95th percentile ranges [i.e., 1800 (1000–2800) lymphocytes per μ l, 653 (286–1125) CD4⁺ T cells per μ l, 163 (65–542) B cells per μ l, 10.5% (4.4–21.5) B cell %]. Medians and 5th–95th percentile ranges in patients are as follows: 793 (286–1805) lymphocytes per μ l, [333 (94–994) CD4⁺ T cells per μ l, 144 (10–420) B cells per μ l, 15.9% (2.5–33.2) B cell %]. Comparisons were performed using the nonparametric signed rank sum test, *** $p < 0.005$.

occurs during sepsis-induced immunosuppression but proportionally affecting B cells to a lesser extent than other lymphocyte subpopulations.

Human leukocyte Ag-DR expression is decreased on B cells after sepsis

As mentioned previously, HLA-DR expression on monocytes was strongly decreased in patients compared with healthy controls ($p < 0.001$; Mann–Whitney *U* test, Fig. 2A). This was observed from D1 after the onset of shock and persisted till D6. When comparing the evolution of mHLA-DR expression in patients with paired samples, we observed a significant increase in mHLA-DR expression only between D3 and D6 ($p < 0.001$, Wilcoxon paired test) but not between D1 and D3 ($p = 0.600$, Wilcoxon paired test).

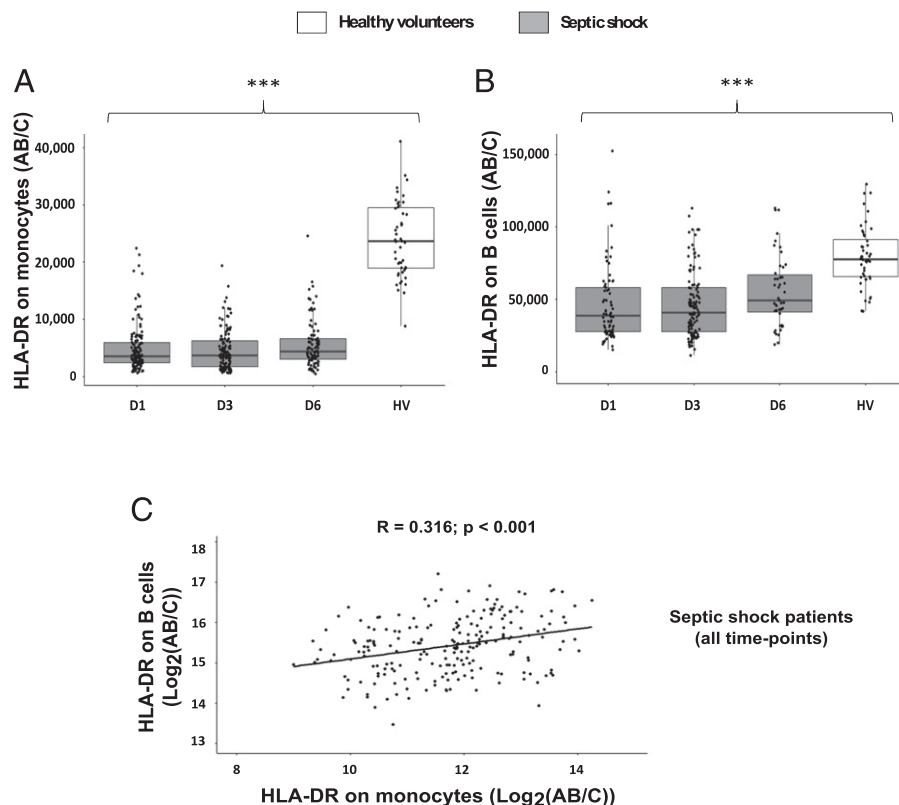
Similarly, we noted a strong decrease in HLA-DR expression on B cells after sepsis that was present at D1 and persisted till D6 ($p < 0.001$; Mann–Whitney *U* test, Fig. 2B). The pattern of HLA-DR expression on B cells followed the one observed on monocytes. It significantly increased in patients with paired samples between D3 and D6 ($p < 0.001$; Wilcoxon paired test) but not between D1 and D3 ($p = 0.600$; Wilcoxon paired test). In this cohort, HLA-DR expression on monocytes and B cells was correlated ($R = 0.316$, $p < 0.001$; Spearman correlation test) (Fig. 2C).

B cell activation and proliferation are altered in septic shock patients

After 24 h of stimulation, B lymphocytes from septic shock patients were significantly less activated than B cells from HV (Fig. 3A). Indeed, after PHA stimulation, CD69 MFI on B cells was 23.3 (13.0–31.6) in septic patients versus 50.6 (43.3–68.2) in HV ($p < 0.001$; Mann–Whitney *U* test). After PWM stimulation, CD69 MFI on B cells was 16.9 (8.0–26.4) in patients versus 30.3 (28.2–41.1) in HV ($p = 0.007$; Mann–Whitney *U* test).

Similarly, B lymphocytes from septic shock patients lost their ability to proliferate compared with B cells from HV (Fig. 3B).

FIGURE 2. Human leukocyte Ag-DR expression is decreased on B cells after sepsis. HLA-DR expression was measured on monocytes (**A**) and B cells (**B**) in patients sampled at D1 [$n = 136$ in (**A**) and $n = 74$ in (**B**)], D3 ($n = 123$), and D6 [$n = 93$ in (**A**) and $n = 47$ in (**B**)] after septic shock and compared with results obtained in healthy donors (HV, open boxes, $n = 48$). Results obtained in patients versus HV were compared using non-parametric Mann-Whitney U test. *** $p < 0.001$. (**C**) Correlation between HLA-DR expression on B cells and monocytes in patients was studied using Spearman correlation test. Results are expressed as numbers of anti-HLA-DR AB/C.



After PHA stimulation, percentage of proliferating B cells was 5.8% (0.6–15.3) in patients compared with 20.4% (17.4–23.7) in HV ($p = 0.022$; Mann-Whitney U test). After PWM stimulation, percentage of proliferating B cells was 2.7% (0.5–18.4) in patients and 19.7% (14.5–24.9) in HV ($p = 0.056$; Mann-Whitney U test), as detected by EdU incorporation.

B cells are phenotypically impaired in septic shock patients with a marked plasmacytosis

We investigated a particular $CD21^{low} CD95^{high}$ phenotype highlighted in a B cell exhaustion context (19) and B cell maturation status through the measurement of CD27 and IgD expression on B cells (20) from samples obtained at D3 after the onset of shock.

We observed a significantly higher proportion of exhausted-like B cells in septic shock patients compared with HV [6.5% (3.9–12.5) versus 3.6% (1.4–3.9) respectively; $p = 0.008$; Mann-Whitney U test] (Fig. 4A). However, no significant difference was noted in the proportions of the different B cell subsets between septic shock patients and HV [i.e., $CD27^{-}IgD^{+}$ naive, $CD27^{+}$ memory, either switched (IgD^{-}) or unswitched (IgD^{+}) B cells] (Fig. 4B).

However, we noticed that septic patients presented with a significantly higher proportion of $CD19^{low}SSC^{Int}$ B cells (Fig. 5A, 5B). We postulated that these cells could be plasma cells (27) and verified whether they expressed CD138 and CD38, two markers of plasma cell differentiation (21). Indeed, those $CD19^{low}SSC^{Int}$ cells were mainly $CD38^{high} CD138^{+}$ (Fig. 5C), and interestingly, plasmacytosis was significantly more important in patients after septic shock than in HV [2.1% (1.4–4.3) versus 0.3% (0.1–0.8) of B cells respectively; $p = 0.0028$, Mann-Whitney U test, Fig. 5D]. This was confirmed through a cell sorting experiment in one patient with high percentage of $CD19^{low}SSC^{Int}$ cells showing that purified $CD19^{low}$ B cells presented the cellular morphology of plasma cells as opposed to sorted $CD19^{high}$ and $CD19^{neg}$ lymphocytes (Fig. 5).

IL-10 production is increased in B cells from septic shock patients

Finally, we measured intracellular IL-10 production in B cells from septic patients sampled at D3 after the onset of shock and from HV before and after stimulation by CpG/CD40L or LPS/CD40L as described in the literature (23, 24). As shown in Fig. 3C, no significant increase in IL-10 production was noted after stimulation of B cells from HV. However, B cells from septic shock patients produced significantly more IL-10 after stimulation compared with their basal state (Fig. 3C). This was observed after both CpG/CD40L ($p = 0.016$, Wilcoxon paired test) and LPS/CD40L stimulations ($p = 0.047$; Wilcoxon paired test).

Discussion

As opposed to T cells, few studies evaluated the B lymphocyte response after sepsis, especially in clinical settings. In addition, most studies were performed during the initial phase of the disease and showed that B cells are activated and play a role in the major proinflammatory immune response occurring postinfection (8, 9, 28, 29). In this prospective study, we show that during the sepsis-induced immunosuppression phase, the B cell response is altered and is shaped toward an exhausted-like profile with an increased proportion of immunoregulatory cells as previously described for T cells.

In this study we describe alterations of B cell response that are very similar to sepsis-induced T lymphocyte dysfunctions. First, in accordance with previous studies (11), we observed a marked decrease in circulating B cell numbers, correlated to an increased B cell expression of CD95 (cell-death receptor Fas). Nevertheless, we showed an increased proportion of B cells among total lymphocytes in septic patients compared with normal reference values from the clinical laboratory. This suggests that B lymphocytes may be less sensitive to the cell-depletion phenomenon observed in sepsis compared with other lymphocyte

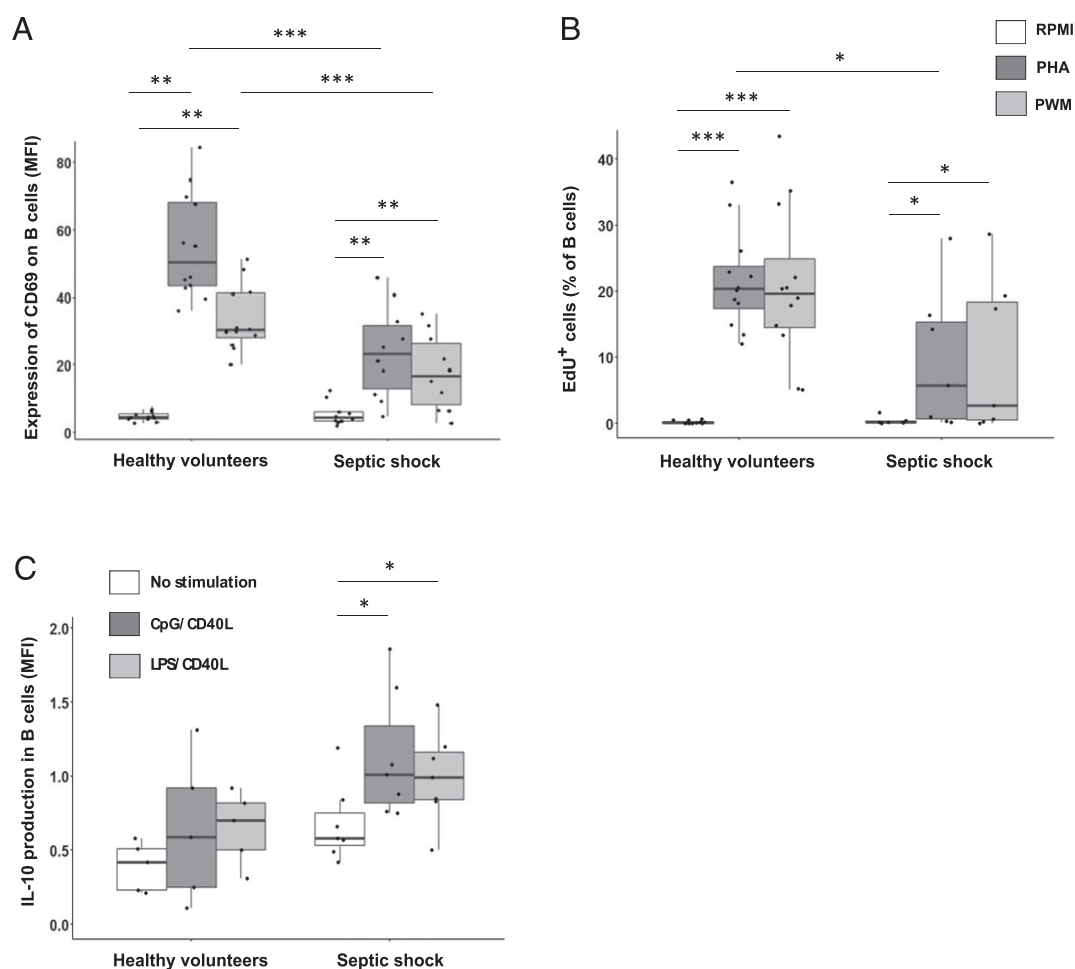


FIGURE 3. B cell activation and proliferation are altered in septic shock patients whereas IL-10 production is increased. At D3 after septic shock, B cell activation capacity was evaluated by CD69 expression on CD19⁺ lymphocytes in 10 patients (A) and B cell proliferation by EdU incorporation on CD19⁺ lymphocytes in 7 patients (B) after incubation of purified PBMCs with either PHA (dark gray boxes) or PWM (light gray boxes), or no stimuli (open boxes). Results from patients were compared with those from 12 healthy donors (open boxes). (C) Intracellular IL-10 expression was measured in PBMCs purified from septic shock patients at D3 ($n = 7$) and healthy donors ($n = 5$) when left unstimulated (open boxes) or after 48 h stimulation with either CpG/CD40L (dark gray boxes) or LPS/CD40L (light gray boxes). Results are expressed as MFI of IL-10 in CD19⁺ B cells. Results from patients and HV were compared using nonparametric Mann–Whitney U tests. Results between incubation conditions were compared for the same patient or HV using nonparametric Wilcoxon paired test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

subtypes such as effector T cells. Recently, Shankar-Hari et al. (30) described an activation-associated B cell death in sepsis patients, affecting mainly memory subsets of B cells. In our study, proportions of B cell subsets in septic shock patients were not modified compared with healthy controls, although a trend was noted toward a decrease of memory B cells.

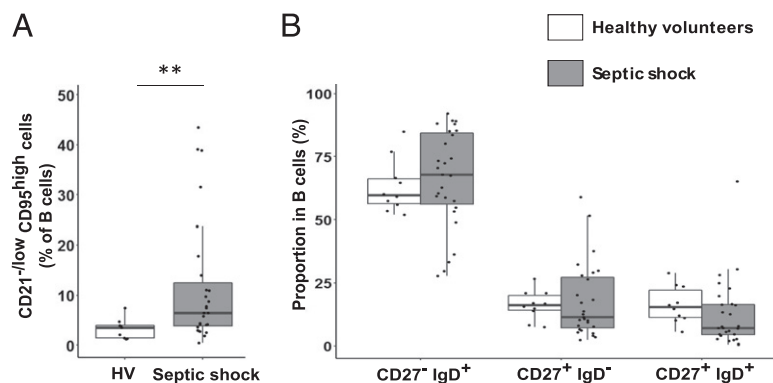
In addition, we show that the remaining B cell phenotype was markedly altered after septic shock. Although the decreased expression of HLA-DR on monocytes has been repeatedly described after septic shock, only one other study investigated HLA-DR expression on B cells in ICU patients (31). In this study, HLA-DR expression on B lymphocytes was significantly lower in trauma patients that were subsequently infected compared with patients that did not. Similarly, we observed an association between reduced HLA-DR expression on B cells at D3 and increased mortality after septic shock (Supplemental Fig. 1). In addition, we observed a correlation between HLA-DR expression on B cells and monocytes from the same patients. Thus, the mechanisms leading to HLA-DR decrease on monocytes after septic shock are probably similarly affecting B cells. We can also speculate that the Ag-presentation capacity of circulating B cells may be strongly altered after sepsis. This could participate in tolerance induction

after septic shock. It would be interesting to study whether sepsis affects the expression of other costimulatory molecules on B cells. Although the decreased Ag-presentation capacity of monocytes has been described in septic patients (32), no such observation has been made regarding B cells and deserves further investigations.

In our study, we highlight an increased proportion of exhausted-like B cells presenting the phenotype CD21^{low} CD95^{high} in septic patients compared with healthy donors. Those results are in accordance with data from Suzuki et al. showing higher CD19⁺ CD21^{−/low} cells in patients (33). Such an exhausted-like B cell population was first described in HIV-infected patients (19). In this initial study, the authors showed that these B cells present with the same features as associated with virus-induced exhaustion of T cells. Because sepsis-induced T lymphocyte exhaustion has been described including increased coinhibitory receptor expression (5, 34), it is tempting to speculate that such deleterious phenomenon may also impact the B cell response after sepsis.

In accordance, we observed that the remaining circulating B cells are dysfunctional in septic patients. Only a few studies performed functional tests on B cells in septic patients. IgG hypogammaglobulinemia has been described in septic patients but its association with mortality is still debated (35). Considering IgM

FIGURE 4. B cells are phenotypically impaired in septic shock patients. **(A)** In 27 patients sampled at D3 after septic shock (gray boxes), B cell exhausted-like profile was evaluated by $CD21^{-/low} CD95^{high}$ phenotype and compared with nine healthy donors (HV, open boxes). **(B)** B cell maturation status was characterized by IgD/CD27 expressions on $CD19^{+}$ lymphocytes and compared with 10 HV. $CD27^{-}IgD^{+}$ naive B cells; $CD27^{+}IgD^{-}$ switched memory B cells; $CD27^{+}IgD^{+}$ unswitched memory B cells. Comparisons were performed using nonparametric Mann–Whitney U test. $**p < 0.01$.



production, it was shown that B cells from septic patients present with a deficiency in IgM synthesis compared with healthy controls, when stimulated or not with CpG-B DNA or PHA (33, 36). In this study, we complete these data by showing a lower

activation capacity and proliferation of remaining circulating B cells in septic shock patients compared with HV. These observations support the hypothesis of a sepsis-induced B cell exhaustion-like phenomenon.

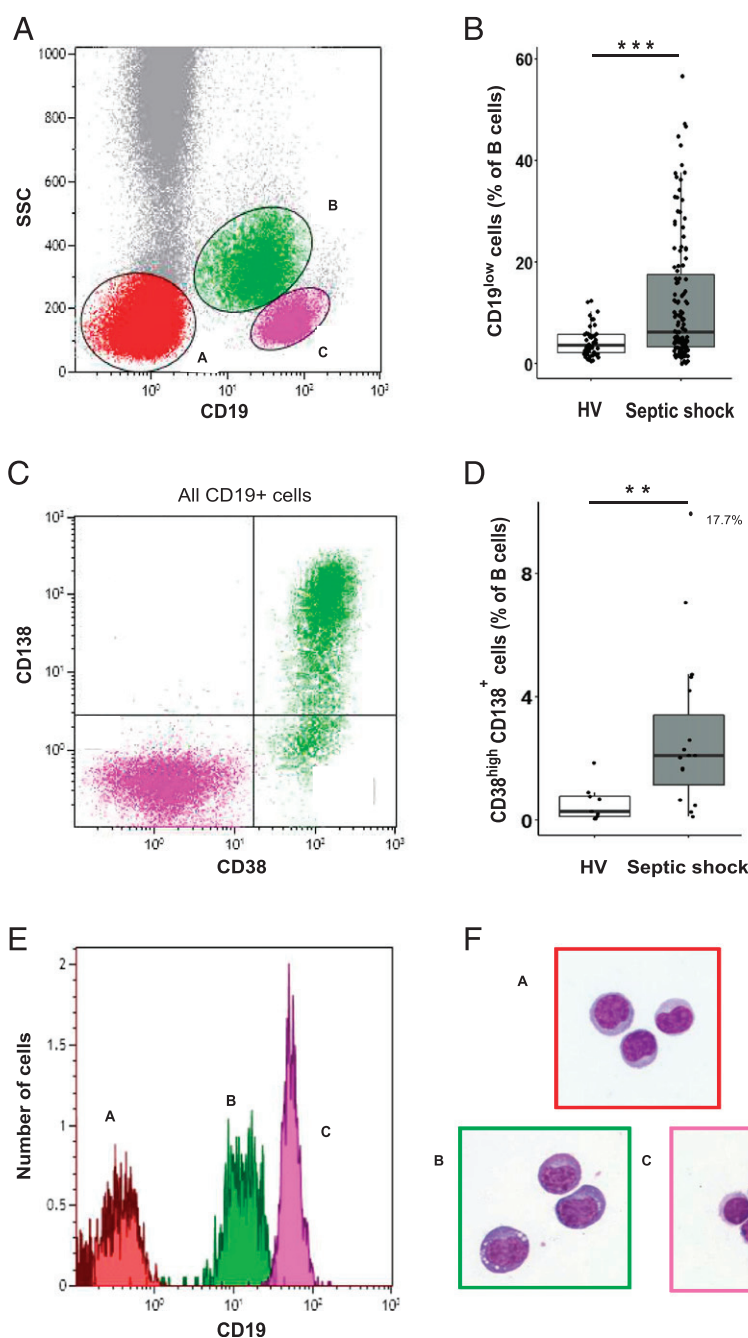


FIGURE 5. Septic shock patients present with a marked plasmacytosis. **(A)** A population of $CD19^{low}$ lymphocytes was noted on CD19/SSC dot plots in septic shock patients' whole blood (green gate). One representative example is shown. **(B)** Proportion of this $CD19^{low}$ population among total $CD19^{+}$ cells was compared between healthy donors (HV, $n = 48$, open box) and septic shock patients samples at D3 ($n = 124$, gray box). **(C)** One representative example of CD38 and CD138 expressions on B cells in a septic shock patient. This highlights the expression of high levels of CD38 and CD138 mainly on $CD19^{low}$ lymphocyte (green dots) compared with $CD19^{high}$ cells (purple dots). **(D)** Percentages of $CD38^{high}CD138^{high}$ lymphocytes among $CD19^{+}$ lymphocytes were compared between HV ($n = 9$, open box) and patients sampled at D3 ($n = 16$, gray box). **(E)** Finally, in one representative patient, lymphocytes were cell-sorted according to CD19 expression: $CD19^{neg}$ (population A in red), $CD19^{low}$ (population B in green) and $CD19^{high}$ lymphocytes (population C in purple). **(F)** After Giemsa staining, slides of each sorted population were analyzed by a histologist blind of cell sorting populations. Purified $CD19^{low}$ B cells presented the cellular morphology of plasma cells as opposed to sorted $CD19^{high}$ and $CD19^{neg}$ lymphocytes. Comparisons between septic shock patients and HV were performed using Mann–Whitney U test. $***p < 0.001$, $*p < 0.05$.

11. Hotchkiss, R. S., S. B. Osmon, K. C. Chang, T. H. Wagner, C. M. Coopersmith, and I. E. Karl. 2005. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J. Immunol.* 174: 5110–5118.
12. Venet, F., F. Davin, C. Guignant, A. Larue, M. A. Cazalis, R. Darbon, C. Allombert, B. Mougin, C. Malcus, F. Poitevin-Later, et al. 2010. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* 34: 358–363.
13. Lampropoulou, V., E. Calderon-Gomez, T. Roch, P. Neves, P. Shen, U. Stervbo, P. Boudinot, S. M. Anderton, and S. Fillatreau. 2010. Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunol. Rev.* 233: 146–161.
14. 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.
15. Charlson, M. E., P. Pompei, K. L. Ales, and C. R. MacKenzie. 1987. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J. Chronic Dis.* 40: 373–383.
16. Le Gall, J. R., S. Lemeshow, and F. Saulnier. 1993. A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270: 2957–2963.
17. Vincent, J. L., A. de Mendonça, F. Cantraine, R. Moreno, J. Takala, P. M. Suter, C. L. Sprung, F. Colardyn, and S. Blecher. 1998. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on “sepsis-related problems” of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit. Care Med.* 26: 1793–1800.
18. 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.
19. Moir, S., J. Ho, A. Malaspina, W. Wang, A. C. DiPoto, M. A. O’Shea, G. Roby, S. Kottlil, J. Arthos, M. A. Proschan, et al. 2008. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J. Exp. Med.* 205: 1797–1805.
20. Maecker, H. T., J. P. McCoy, and R. Nussenblatt. 2012. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 191–200.
21. Caraux, A., B. Klein, B. Paiva, C. Bret, A. Schmitz, G. M. Fuhler, N. A. Bos, H. E. Johnsen, A. Orfao, and M. Perez-Andres. Myeloma Stem Cell Network. 2010. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica* 95: 1016–1020.
22. 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.
23. Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dillillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, et al. 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117: 530–541.
24. Bankó, Z., J. Pozsgay, D. Szili, M. Tóth, T. Gáti, G. Nagy, B. Rojkovich, and G. Sármay. 2017. Induction and differentiation of IL-10-producing regulatory B cells from healthy blood donors and rheumatoid arthritis patients. *J. Immunol.* 198: 1512–1520.
25. 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.
26. Monneret, G., A. Lepape, and F. Venet. 2011. A dynamic view of mHLA-DR expression in management of severe septic patients. *Crit. Care* 15: 198.
27. Harada, Y., M. M. Kawano, N. Huang, M. S. Mahmoud, I. A. Lisukov, K. Mihara, T. Tsujimoto, and A. Kuramoto. 1996. Identification of early plasma cells in peripheral blood and their clinical significance. *Br. J. Haematol.* 92: 184–191.
28. Mohr, A., J. Polz, E. M. Martin, S. Griessl, A. Kammler, C. Pötschke, A. Lechner, B. M. Bröcker, S. Mostböck, and D. N. Männel. 2012. Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. *Eur. J. Immunol.* 42: 341–352.
29. Monserrat, J., R. de Pablo, D. Diaz-Martín, M. Rodríguez-Zapata, A. de la Hara, A. Prieto, and M. Alvarez-Mon. 2013. Early alterations of B cells in patients with septic shock. *Crit. Care* 17: R105.
30. Shankar-Hari, M., D. Fear, P. Lavender, T. Mare, R. Beale, C. Swanson, M. Singer, and J. Spencer. 2017. Activation-associated accelerated apoptosis of memory B cells in critically ill patients with sepsis. *Crit. Care Med.* 45: 875–882.
31. Ditschkowski, M., E. Kreuzfelder, V. Rebmann, S. Ferencik, M. Majetschak, E. N. Schmid, U. Obertacke, H. Hirche, U. F. Schade, and H. Grosse-Wilde. 1999. HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Ann. Surg.* 229: 246–254.
32. Manjuck, J., D. C. Saha, M. Astiz, L. J. Eales, and E. C. Rackow. 2000. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J. Lab. Clin. Med.* 135: 153–160.
33. Suzuki, K., S. Inoue, Y. Kametani, Y. Komori, S. Chiba, T. Sato, S. Inokuchi, and S. Ogura. 2016. Reduced immunocompetent B cells and increased secondary infection in elderly patients with severe sepsis. *Shock* 46: 270–278.
34. Guignant, C., A. Lepape, X. Huang, H. Kherouf, L. Denis, F. Poitevin, C. Malcus, A. Chéron, B. Allaouchiche, F. Gueyffier, et al. 2011. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care* 15: R99.
35. Shankar-Hari, M., N. Culshaw, B. Post, E. Tamayo, D. Andaluz-Ojeda, J. F. Bermejo-Martín, S. Dietz, K. Werdan, R. Beale, J. Spencer, and M. Singer. 2015. Endogenous IgG hypogammaglobulinaemia in critically ill adults with sepsis: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 41: 1393–1401.
36. Giamarellos-Bourboulis, E. J., E. Apostolidou, M. Lada, I. Perdios, N. K. Gatselis, I. Tsangaris, M. Georgitsi, M. Bristianou, T. Kanni, K. Sereti, et al; Hellenic Sepsis Study Group. 2013. Kinetics of circulating immunoglobulin M in sepsis: relationship with final outcome. *Crit. Care* 17: R247.
37. Monneret, G., A. L. Debar, 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.
38. Pan, X., Z. Ji, and J. Xue. 2016. Percentage of peripheral CD19+CD24hiCD38hi regulatory B cells in neonatal sepsis patients and its functional implication. *Med. Sci. Monit.* 22: 2374–2378.
39. Neves, P., V. Lampropoulou, E. Calderon-Gomez, T. Roch, U. Stervbo, P. Shen, A. A. Kühl, C. Loddenkemper, M. Haury, S. A. Nedospasov, et al. 2010. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* 33: 777–790.

Septic shock shapes B cell response toward an exhausted / immunoregulatory profile in patients

Online Data Supplement

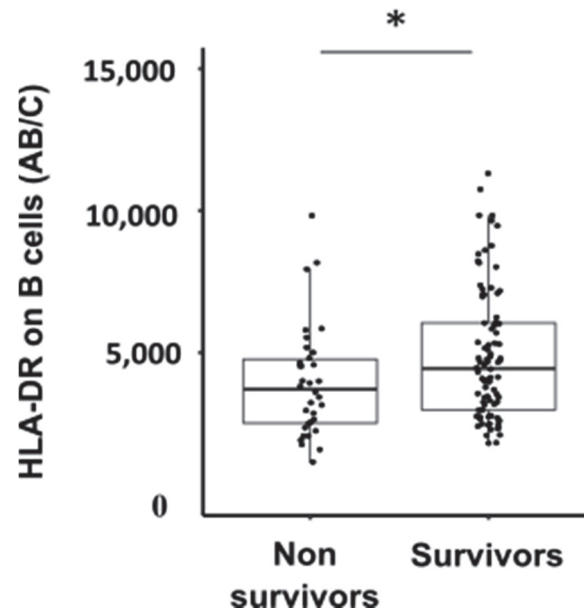
Supplementary Table I. Clinical and biological data for septic shock patients

		Septic shock patients (n = 138)
Age at admission (years)		69 (61-80)
Male		96 (69.6 %)
Main admission category	Medical	80 (58.0%)
	Surgery	58 (42.0%)
Comorbidities	0	37 (26.8%)
	≥1	101 (73.2%)
SAPS II score		64 (50-77)
SOFA score		11 (9-13)
McCabe score	0	93 (67.4%)
	1	34 (24.6%)
	2	11 (8.0%)
Serum lactate level at admission (mmol/L)		2.2 (1.5-3.8)
Patients with lactate > 2mmol/L		72* (52.9%)
Infection diagnosis	Microbiology	87 (63.0%)
	Radiology	22 (15.9%)
	Surgery	20 (14.5%)
Microbiologically documented	BGN	54 (39.1%)
	CGP	27 (19.6%)
	Fungi	4 (2.9%)
	Other	8 (5.8%)
Type of infection	Community acquired	88 (63.8%)
	Nosocomial	50 (36.2%)
Site of infection	Pulmonary	53 (38.4%)
	Abdominal	42 (30.4%)
	Other	43 (31.2%)
ICU-acquired nosocomial infections		27 (19.6%)
Immune parameters at D3 after septic shock	mHLA-DR (AB/C)	3,749 (1,712-6,282)
	CD4 ⁺ T cell count (cells/μl)	328 (191-539)

One hundred and thirty-eight septic shock patients were included in this study. Values are presented as numbers and percentages for categorical variables and as medians and (Q1-Q3) interquartile ranges for continuous variables. SAPSII: Simplified Acute Physiological Score II. SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment score. BGP: Bacilli Gram Negative. CGP: Cocci Gram Positive. mHLA-DR: cell surface expression of HLA-DR on circulating monocytes. AB/C: number of antibodies bound per cell. Ly: lymphocytes. Normal value for mHLA-DR is > 15,000 AB/C indicative of immunocompetence (1). In-lab normal age-matched values for CD4⁺ T cell absolute count are 336 – 1126 cells/μL.

*Serum lactate level was not measured at admission for two patients.

Supplementary Figure 1. HLA-DR on B cells is lower in non survivors compared to survivors after septic shock

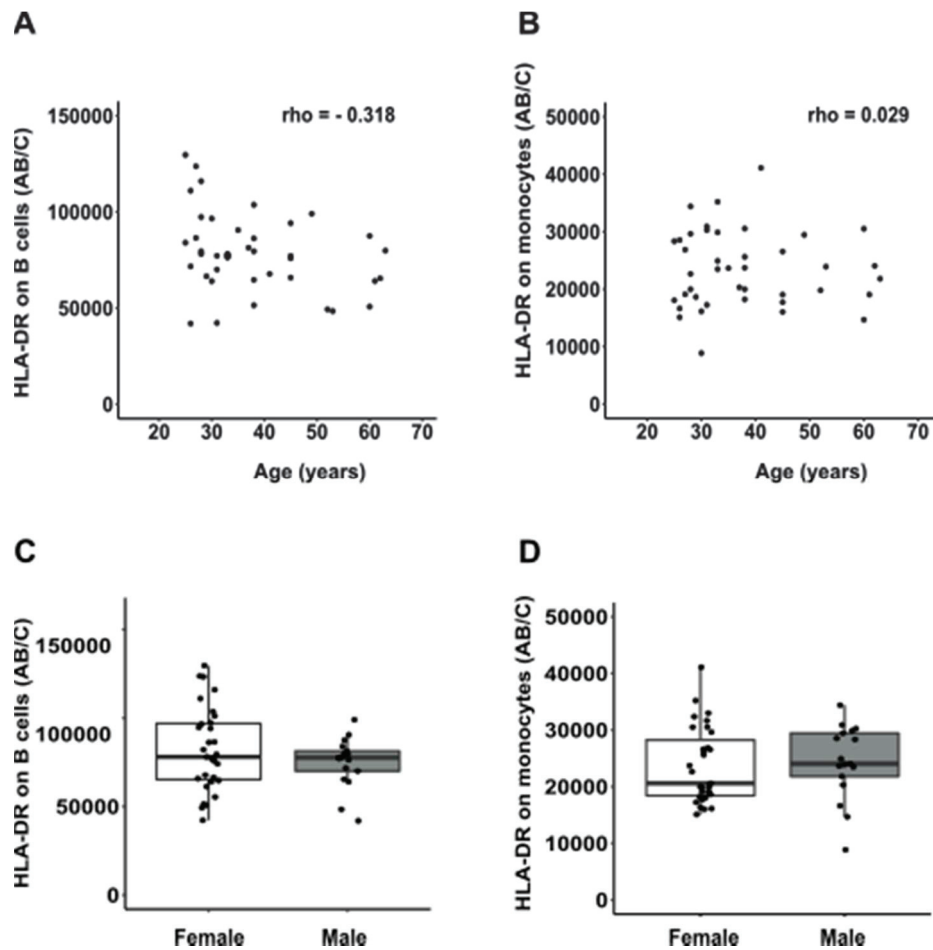


HLA-DR expression on B cells was measured at D3 in septic shock patients. Results from survivors (n = 88) and non survivors (n = 34) at day 28 were compared using non-parametric Mann-Whitney test.

* p = 0.033

Results are expressed as numbers of anti-HLA-DR antibodies bound per cells (AB/C).

Supplementary Figure 2. HLA-DR expression on B cells and monocytes is not dependent on age nor sex.



HLA-expression was measured in 48 healthy volunteers. Association between age and HLA-DR expression on B cells (A) and monocytes (B) was studied using Spearman correlation. HLA-DR expression on B cells (C) and monocytes (D) was compared on 31 females and 17 males using non-parametric Mann-Whitney test. Results are expressed as numbers of anti-HLA-DR antibodies bound per cells (AB/C).

ARTICLE 2 : UTILISATION DE LA CYTOMETRIE DE MASSE POUR CARACTERISER LES ALTERATIONS IMMUNITAIRES INDUITES CHEZ LES PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE

(Sci Rep. 2018 Nov 23;8(1):17296)

A. Contexte et objectif

En parallèle de l'étude du statut des lymphocytes B au cours du choc septique, nous avons évalué une méthode d'analyse multidimensionnelle. En effet, la cytométrie en flux est l'un des outils le plus utilisé dans l'exploration des altérations immunitaires, mais ne permet pas d'analyser plus d'une dizaine de marqueurs simultanément. Une technologie innovante de phénotypage dérivée de la cytométrie en flux a récemment vu le jour. Cette technique appelée « cytométrie de masse » (ou « CyTOF ») utilise des anticorps monoclonaux couplés à des métaux lourds, détectés par spectrométrie de masse. Ainsi, elle s'affranchit des problèmes liés à la fuite de fluorescence dans les différents détecteurs d'un cytomètre en flux classique, et permet d'analyser jusqu'à 50 marqueurs simultanément, au niveau intra et extracellulaire. Cette technologie offre ainsi de nouvelles perspectives à la caractérisation des altérations immunitaires induites par le sepsis (Cf Annexe 1). Néanmoins, elle n'a encore jamais été utilisée pour l'étude de cohorte clinique de patients septiques. ***Ainsi, l'objectif de notre étude était de démontrer la faisabilité et l'intérêt de l'utilisation du CyTOF dans la caractérisation des altérations immunitaires observées chez les patients en choc septique.***

B. Description et principaux résultats de l'étude

Nous avons conçu un panel de cytométrie de masse composé de 25 marqueurs extracellulaires caractéristiques des principales sous-populations leucocytaires, ainsi que de leur état d'activation et de différenciation. Après une phase de mise au point du protocole de congélation, une biobanque de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de patients en choc septiques inclus à J3 après le choc et de volontaires sains a été construite. Au final, 5 patients et 5 volontaires sains ont été analysés par CyTOF. Différentes approches d'analyse non-supervisée telles que visNE et Spade ont été utilisées pour analyser les données multidimensionnelles générées.

Nous avons d'abord confirmé la validité de nos données et de la méthode d'analyse utilisée en mettant en évidence des altérations clés du sepsis (*e.g.* diminution du mHLA-DR, augmentation de l'expression de PD1 sur les T CD4 et de PD-L1 sur les monocytes). Nous avons ensuite révélé de nouvelles altérations immunitaires, telles qu'une transition des lymphocytes B vers un état de différenciation plasmocytaire au détriment des cellules naïves, ou encore une réponse uniforme

post-septique de certains marqueurs sur les différentes populations monocytaires, définissant une signature immunitaire chez les patients.

C. Conclusion

Ce travail a permis d'une part de prouver la faisabilité de l'utilisation du CyTOF pour l'étude de cohortes cliniques de patients en choc septique et la robustesse des données générées. D'autre part, nous avons démontré l'intérêt du CyTOF à révéler de nouvelles altérations immunitaires induites par le choc septique, notamment sur certaines sous-populations cellulaires minoritaires. Ainsi, malgré l'effectif limité de notre cohorte, la puissance de cet outil a permis de confirmer la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes après le choc septique. Le CyTOF paraît donc très prometteur pour la caractérisation exhaustive des altérations immunitaires induites par le sepsis. Des études multicentriques ainsi que des études de cohortes de plus grands effectifs sont maintenant nécessaires pour confirmer l'utilité de cet outil.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Proof of concept study of mass cytometry in septic shock patients reveals novel immune alterations

Morgane Gossez^{1,2}, Thomas Rimmelé^{2,3}, Thibault Andrieu⁴, Sophie Debord³,
Frédérique Bayle³, Christophe Malcus¹, Françoise Poitevin-Later¹, Guillaume Monneret^{1,2} &
Fabienne Venet^{1,2}

Received: 4 September 2018

Accepted: 13 November 2018

Published online: 23 November 2018

Innovative single cell technologies such as mass cytometry (CyTOF) widen possibilities to deeply improve characterisation of immune alterations mechanisms in human diseases. So far, CyTOF has not been used in sepsis – a condition characterized by complex immune disorders. Here, we evaluated feasibility of CyTOF analysis in patients with septic shock. We designed a mass cytometry panel of 25 extracellular markers to study mononuclear cells from 5 septic shock patients and 5 healthy donors. We explored single-cell data with global and specific unsupervised approaches such as heatmaps, SPADE and viSNE. We first validated relevance of our CyTOF results by highlighting established immune hallmarks of sepsis, such as decreased monocyte HLA-DR expression and increased expressions of PD1 and PD-L1 on CD4 T cells and monocytes. We then showed that CyTOF analysis reveals novel aspects of sepsis-induced immune alterations, *e.g.* B cell shift towards plasma cell differentiation and uniform response of several monocyte markers defining an immune signature in septic patients. This proof of concept study demonstrates CyTOF suitability to analyse immune features of septic patients. Mass cytometry could thus represent a powerful tool to identify novel pathophysiological mechanisms and therapeutic targets for immunotherapy in septic shock patients.

Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection¹. The World Health Organization has recently acknowledged sepsis as a major health care issue². Indeed, incidence of septic syndromes is continuously increasing, affecting more than 35% of patients hospitalized in intensive care units (ICU) in Europe³. Moreover, septic shock, *i.e.* subset of sepsis with acute circulatory failure, is associated with mortality up to 45% in the ICU despite improvements in early care of organ dysfunctions⁴.

Thus, research effort focuses on finding specific treatment for sepsis. In the last few years, there has been renewed interest for the role and underlying mechanisms of sepsis-induced immunosuppression. Indeed, it has been demonstrated that immune alterations observed after sepsis were associated with increased risk of secondary infections and mortality⁵. Recently, new therapeutic approaches targeting these alterations in patients with persistent immunosuppression have emerged. Relevance of this strategy has been lately illustrated by encouraging results from a phase II trial using interleukin 7 as an immunoadjuvant therapy targeting adaptive immunity defects in septic shock patients⁶. Nevertheless, pathophysiology of immune dysfunctions developed after sepsis remains incompletely understood. Yet, exhaustive characterisation of these immune alterations is fundamental to highlight potential new targets and biomarkers, which would allow development of immune-based therapy of this hitherto deadly disease.

Such comprehensive studies of sepsis-induced host response and immune alterations were long limited by technology issues. Emergence of innovative single cell technologies widens possibilities to improve our understanding of sepsis pathophysiology in humans^{7,8}. Particularly, mass cytometry (CyTOF) is a promising alternative to multicolour flow cytometry allowing to measure above 40 parameters simultaneously⁹. Indeed, CyTOF uses monoclonal antibodies conjugated with metal isotopes, avoiding common autofluorescence and spectral overlap

¹Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France. ²EA 7426 "Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression – PI3", Université Claude Bernard Lyon 1/bioMérieux/Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France. ³Hospices Civils de Lyon, Anesthesia and Critical Care Medicine Department, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France. ⁴Univ Lyon, SFR Biosciences, ENS de Lyon, Inserm US8, CNRS UMS344, UCBL, Lyon, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.G. (email: morgane.gossez@chu-lyon.fr)

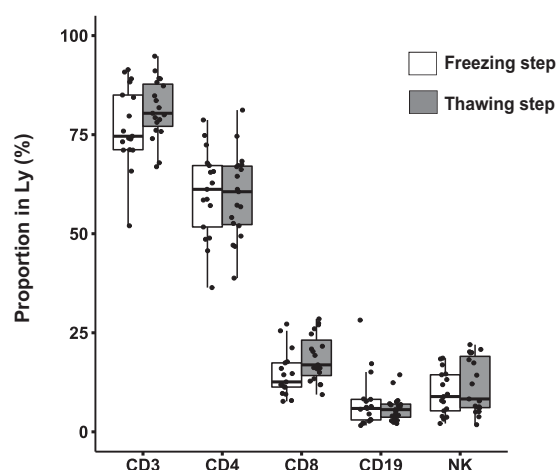


Figure 1. No deletion of a particular lymphocyte sub-populations is noted during the whole mass cytometry analysis process. Before freezing (white boxes) and after thawing (grey boxes) processes, proportions of lymphocyte sub-populations in mononuclear cells were analysed by flow cytometry in 10 samples from healthy volunteers and 11 samples from septic shock patients.

issues occurring with conventional flow cytometry. These properties allow broad phenotypic exploration of several immune populations at once.

In this study, we used for the first time CyTOF technology to analyse immune alterations in a cohort of patients with septic shock. As a preliminary proof of concept study, the main objective was to evaluate feasibility and opportunities provided by mass cytometry in this clinical context. We designed a mass cytometry panel comprising 25 antibodies to explore mononuclear cell features from septic shock patients and healthy donors. Unsupervised analysis strategies such as SPADE¹⁰ and viSNE¹¹ were used to highlight novel aspects of immune alterations developed after septic shock.

Results

Set up of blood processing and mass cytometry analysis. First, we tested 4 freezing protocols which differed in freezing and thawing media and in freezing/thawing steps (see Supplementary Table S1). We observed similar yield in number of cells available after thawing between the 4 protocols. However, protocol #4 was more convenient and easy to use, and included the use of DNase during the thawing step, which allowed to avoid cell aggregates, especially in septic shock patients' samples. Protocol #4 was thus selected to build the biobank.

Next, we collected 10 samples from healthy volunteers and 11 samples from septic shock patients included at day 3 after the onset of septic shock. As significant loss in number of cells is commonly observed during freezing/thawing process⁷, we first assessed the recovery of proportion of lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry before freezing and after thawing steps. Using the analytical conditions described above to process our samples, no loss of any particular lymphocyte population was noted, allowing further data analysis (Fig. 1). The number of viable cells available after the whole process was adequate for a relevant mass cytometry analysis.

CyTOF analysis in septic shock patients. Due to limited access to CyTOF platform, we restrained the number of samples analysed by mass cytometry to 5 healthy volunteers and 5 septic patients. As our mass cytometry panel was designed for studying mononuclear cells, we selected the 5 septic shock samples presenting with the highest proportion and number of mononuclear cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) layer after Ficoll. Clinical and biological data for the 5 septic shock patients are presented in Supplementary Table S2. Median [IQR] age of the healthy volunteers (HV) was 61 [53–63] years old and 40% were male.

The analysis pipeline used throughout the study is illustrated in Fig. 2. To characterize and visualize mononuclear cells' subpopulations in the observational cohort, we ran a SPADE clustering analysis. SPADE algorithm first downsamples data to capture rare populations. Then it hierarchically clusters phenotypically similar cells into "nodes" and represents these nodes and their relationships in a minimum spanning tree format (*i.e.* SPADE tree). The main issue with SPADE analysis is the definition of the optimal number of cell clusters. This is difficult to determine empirically. Firstly, to address this problem, we determined with X-shift algorithm the optimized cluster number for our dataset, as described elsewhere¹². X-shift algorithm uses weighted *k*-nearest-neighbour density estimation to define the optimal number of cell clusters in high dimensional data. For this, X-shift evaluates the impact of different numbers of nearest neighbours on the number of cell clusters, with the optimal number of cell clusters defined at the "switch point" between under-clustering and over-fragmenting data. In our dataset, optimal cluster number was found at 78. Secondly, from this result we ran a SPADE analysis seeking 78 nodes. For further analysis, only nodes with an average proportion $\geq 0.5\%$ of total cells were selected, in order to exclude sparse clusters where low cell numbers could potentially increase the error of reported medians. This threshold resulted in exclusion of approximately 6% of total cells, thus retaining 51 nodes for further analysis (see Supplementary Fig. S1A). The individual SPADE trees for control and septic samples are shown in Supplementary Fig. S1B. We thus finally identified cell types for each of the 51 cell nodes drawing a heatmap depicting the mean expression of 19 lineage or cellular differentiation markers (Fig. 3).

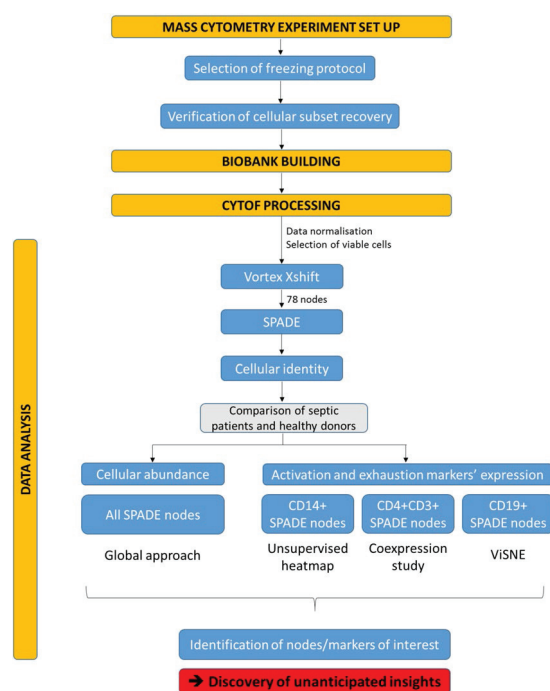


Figure 2. Analysis pipeline used throughout the study. The study was built through several steps: set up of mass cytometry analysis, process of samples on mass cytometer and data analysis. In this last step, several multidimensional data analysis tools were used, such as SPADE and viSNE, to highlight differences between septic shock patients and healthy donors in terms of cellular abundance and expression levels of exhaustion, activation and differentiation markers.

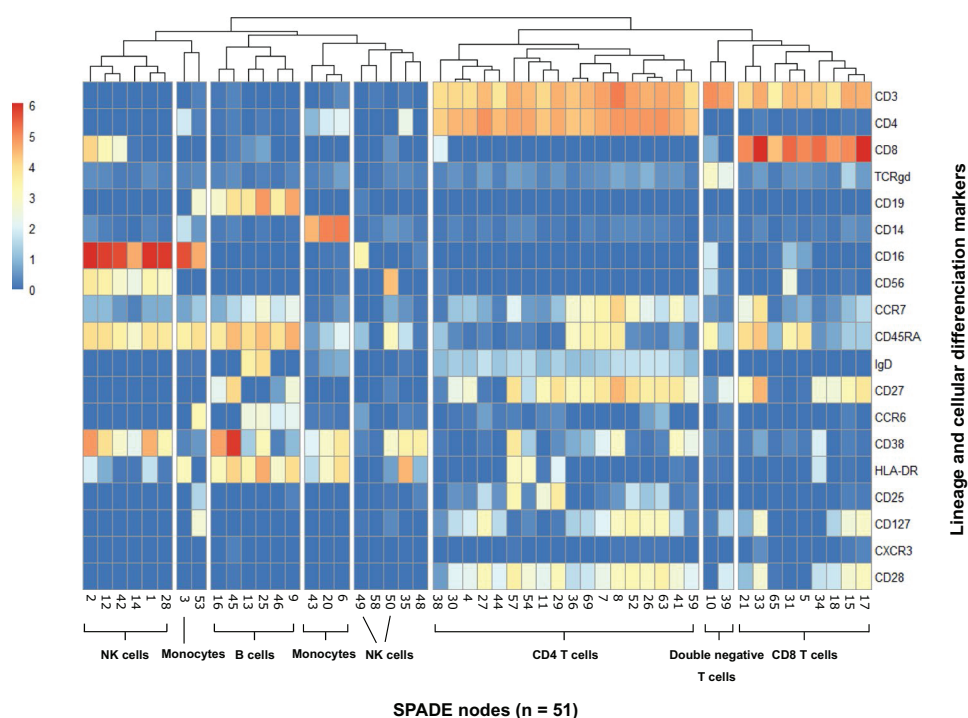


Figure 3. Expression of phenotypic markers used for node characterisation. Median expression for each marker was averaged from all 10 samples for each of the 51 nodes. Results are shown on heatmap after hierarchical clustering. Colour intensity specifies the expression level. Combined expression of several markers allowed to identify characteristic leukocyte populations, but also rare cell subsets. For instance, two populations of CD3⁺ cells but double negative CD4[−]CD8[−] were noted, both expressing TCR $\gamma\delta$, but showing different features, such as the expression level of CD8, CD16 and CD56.

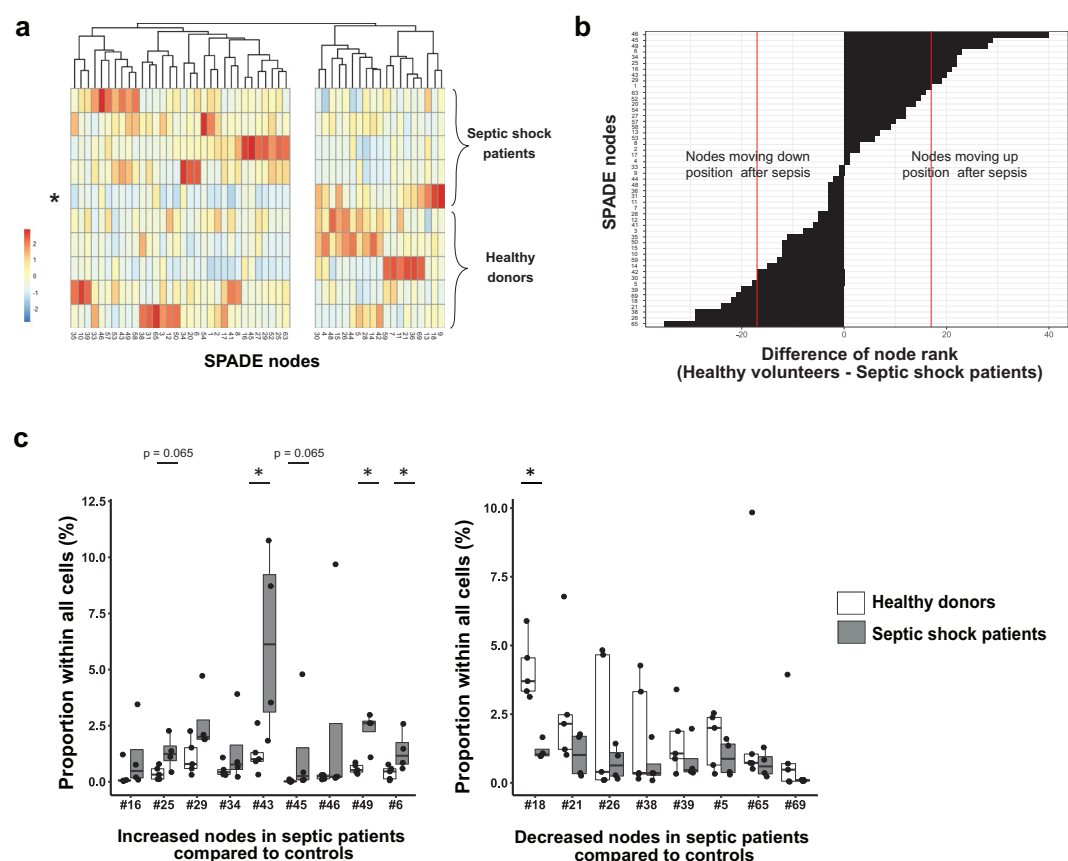


Figure 4. Significant variations in node proportions are observed after septic shock. (A) For the 5 healthy donors and 5 septic shock patients, individual proportions of each SPADE node were plotted onto a heatmap. The red and blue colours indicate increased and decreased proportions respectively. Order of nodes was determined by non-supervised hierarchical clustering. On the right side of the heatmap were clustered nodes that seemed decreased in septic patients compared to controls. On the left side were clustered nodes that looked increased in septic shock patients. Septic patient presenting mHLA-DR > 20,000 AB/C and excluded from further analyses is indicated by a star. (B) To highlight SPADE nodes with important variations in cell proportions between healthy donors and septic patients, nodes were ranked by descending order according to their average proportions in controls ($n = 5$) and in septic shock patients ($n = 4$). The rank difference between healthy volunteers and septic patients was calculated and plotted for each node. A difference (controls - septic patients ranks) under 0 reflected a decrease of cell number within the node in septic patients, whereas a positive difference suggested an increased node proportion in septic patients compared to healthy donors. Arbitrary, proportion variation was considered non-negligible when a node's rank differed more than 1/3 of total node number, reflecting a gain or loss of more than 17 positions (red lines). (C) Potentially increased (left plot) or decreased (right plot) nodes' frequencies were plotted for septic shock patients ($n = 4$; grey boxes) and healthy donors ($n = 5$; white boxes) samples as boxplots with individual values. Node proportions between controls and septic shock patients were compared using Mann-Whitney tests. * $p < 0.05$.

Node distribution shows different proportions in septic shock patients compared to healthy donors. Next, we compared node proportions between septic patients and healthy volunteers. We drew a new heatmap representing proportions of each node in each individual (Fig. 4A). Clustering highlighted two groups of nodes, including respectively nodes with increased and decreased proportions in septic patients compared to healthy donors. Intriguingly, one septic shock patient showed a pattern of node's proportions very similar to healthy volunteers. When analysing clinical data for this patient, result of HLA-DR expression on monocyte (mHLA-DR) was 20,445 antibodies/cell (AB/C) whereas the four other septic patients had a mHLA-DR < 10,000 AB/C. As we focused on sepsis-induced immunosuppression, we decided to exclude this patient in further analyses, to avoid a risk of masking potential differences between controls and septic patients in this small cohort.

To identify nodes with the most important variations in cell proportion between HV and septic shock patients, we ranked nodes according to their average proportions in HV and in patients respectively. For each node, the rank difference between HV and septic patients reflected increased or decreased proportion after septic shock. For further analysis, we selected only the nodes with a rank difference of more than 1/3 of total node number (Fig. 4B). Thus, we identified 9 increased cells and 8 decreased nodes after septic shock. Interestingly, all 8 decreased nodes were CD4 or CD8 T cells while the 9 increased nodes were mainly non-T cells. Especially, 4

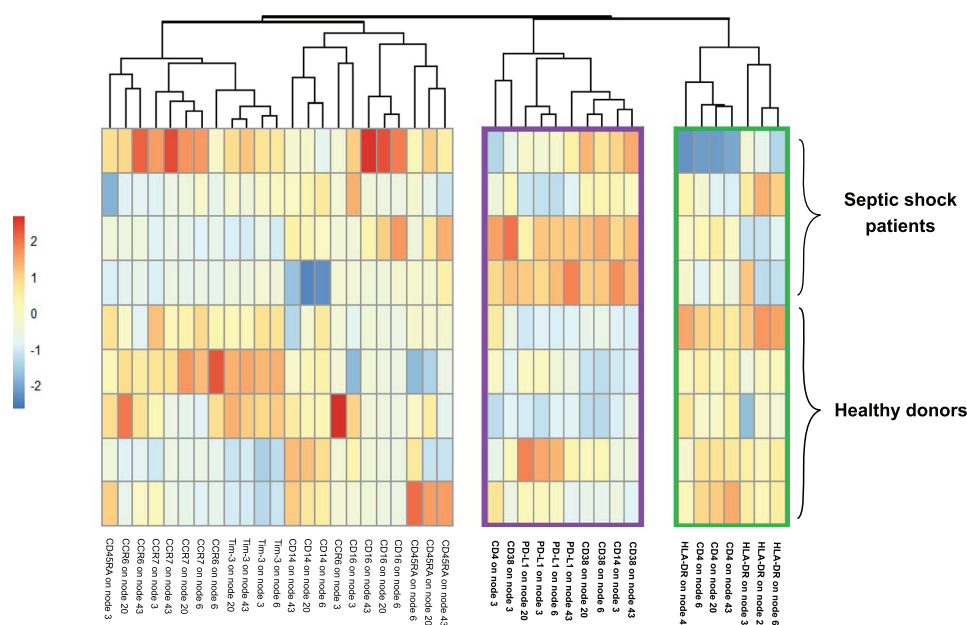


Figure 5. Expression of 4 monocyte markers is regulated after septic shock. After normalisation, median expression of phenotypic markers on each SPADE node of monocytes was shown on heatmap after hierarchical clustering for 4 septic shock and 5 healthy donors. The red and blue colours indicate over- and under-expressed markers respectively and the colour intensity specifies the expression level. Rectangles in green and purple indicate respectively markers down-regulated and up-regulated on particular nodes in septic shock patients compared to controls.

nodes were B cell clusters, highlighting a potential enrichment after septic shock in this usually sparsely represented leukocyte subpopulation.

So as to confirm these changes between groups, we analysed node frequencies across individuals in the 17 selected nodes, especially to get rid of average variations that could hide high inter-individual variations. Figure 4C shows significant proportion increases in nodes #6, 43 and 49 in septic shock patients ($p < 0.05$; Mann-Whitney). These 3 nodes appeared to be conventional monocytes $CD14^+HLA-DR^+$, particular monocytes $CD14^+HLA-DR^{low}$ and a population of $CD56^-CD16^+$ cells respectively. A significant decrease in node #18 representing specific effector memory CD8 T cells was also observed in patients ($p < 0.05$; Mann-Whitney). Finally, we noted a trend towards increased proportions of nodes #25 and 45 ($p = 0.065$; Mann-Whitney), which represented naïve B cells and plasmablasts respectively.

Specific phenotype changes are observed on leukocytes after septic shock. In order to highlight the broad potential of mass cytometry data analysis, we next investigated phenotypic changes in activation and exhaustion markers' expression, using three different approaches: unsupervised heatmap, coexpression study and viSNE algorithm. These approaches were applied on monocytes, CD4 T cells and B cells respectively, selecting SPADE nodes according to the expression of lineage markers CD14, CD3/CD4, and CD19 (Fig. 2).

Uniform modifications in monocyte expression of 4 specific markers after septic shock. First, we were interested in monocyte activation and immunoregulatory profile after septic shock. We drew a heatmap of individual expression of activation markers (CD4, CD14, CD16, CD38, CCR6, CCR7, CD45RA) and immune checkpoint inhibitors (PD-L1 and Tim-3) on each of the 4 monocytes nodes from SPADE (i.e. nodes #3, #6, #20 and #43) (Fig. 5). PD1 and Lag-3 were not expressed at all on monocytes. Unsupervised clustering revealed three groups of markers depending on their modulation of expression on monocytes after septic shock. Interestingly, markers with increased (purple rectangle) or decreased (green rectangle) expression in septic patients were uniformly modulated on all monocyte nodes. Indeed, septic patients presented with an increased expression of CD38 and PD-L1, as well as a decreased expression of HLA-DR and CD4 on all septic monocyte nodes compared to healthy donors, except on node #3 for the latter parameter.

High heterogeneity in PD1+ CD4 T cells after septic shock, without coexpression of other immune checkpoint inhibitors. Considering the expanding importance of immunostimulating therapies targeting immune checkpoint inhibitors, we studied expression of PD1, PD-L1 and Tim-3 on the 18 CD4 T cell nodes from SPADE (Fig. 6A). This was performed by representing individual values and box-plots of MFI of each marker on all CD4 T cell nodes in HV and patients. In addition, showing background signal measured on a mass-minus-one (MMO) sample for each marker was helpful to compare co-expressions. No difference of Tim-3 or PD-L1 expressions was observed between HV and septic patients. In HV, PD1 was systematically expressed on a unique node (#63). However, in septic shock patients PD1 exhibited increased expression on node #63 and appeared on several other

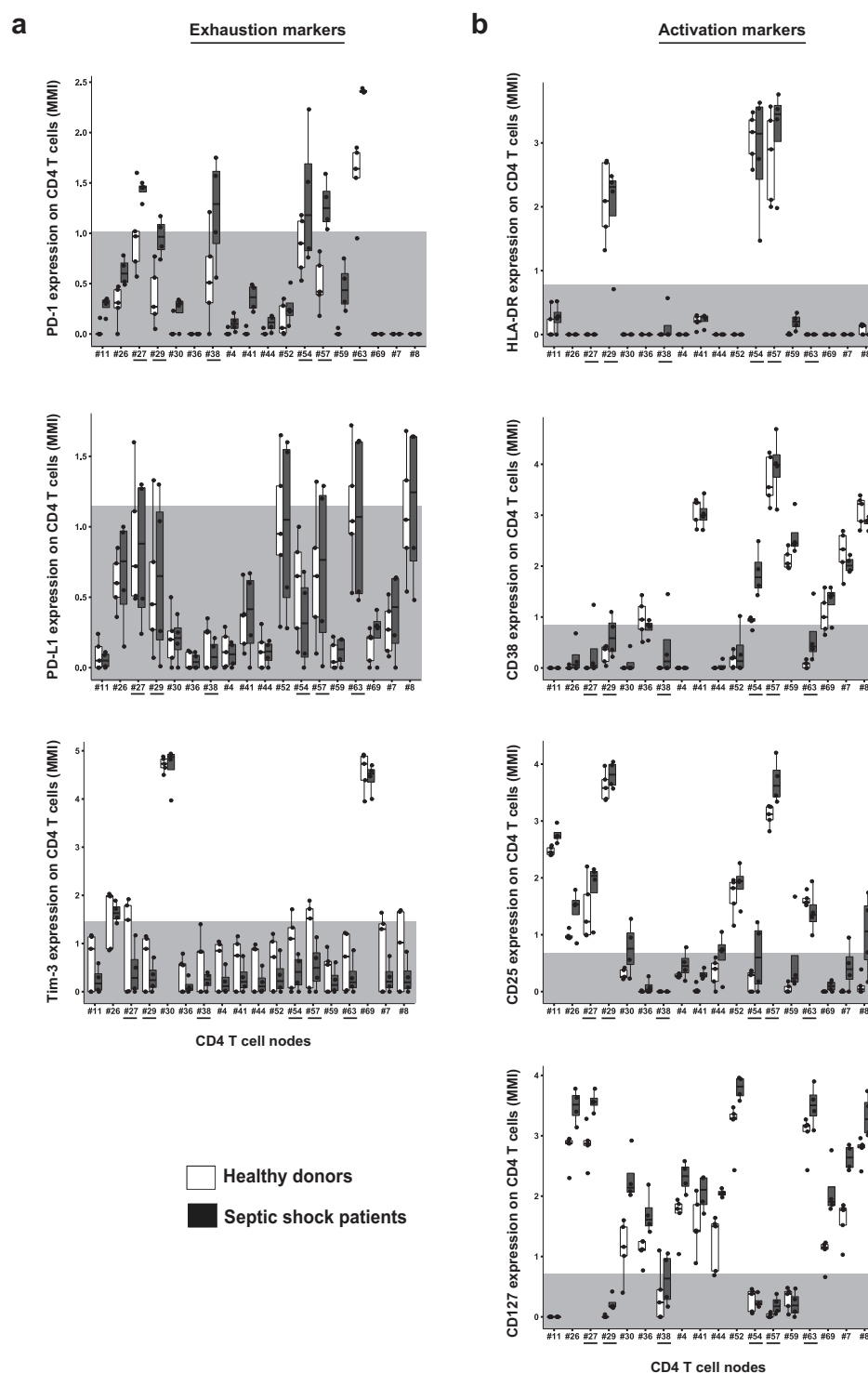


Figure 6. PD1 expressing CD4 T cells show high heterogeneity after septic shock and do not co-express other immune checkpoint inhibitors. Expressions of several exhaustion (A) and activation (B) markers on CD4 T cell nodes from SPADE were compared in septic shock patients (n = 4, dark grey boxes) and healthy volunteers (n = 5, white boxes). The light grey areas represent global median expression on CD4 T cells from mass-minus-one control, characterising the threshold of positive expression for each marker. PD-1 expressing nodes are highlighted underlined.

nodes, *i.e.* nodes #27, #29, #38, #54 and #57. Co-expression of PD1 and PD-L1 was rarely observed. Interestingly, Tim-3 was expressed only on 2 nodes, and was not co-expressed with neither PD1 nor PD-L1. Next, we studied expression of HLA-DR, CD38, CD25 and CD127 on these five PD1⁺ nodes to investigate whether the increased

expression of PD1 was associated with expression of activation markers (Fig. 6B). There was almost no expression of these markers on node #38, which was the only node of double positive CD4⁺ CD8⁺ T cells. Nodes #27 and #63 did not express HLA-DR nor CD38, but were CD25⁺ and showed high expression of CD127, suggesting potential resting memory cells. Node #54 had a profile of activated effector cells, HLA-DR⁺ CD38⁺ CD25^{low} and CD127⁻. Finally, high expressions of HLA-DR, CD38 and CD25 on nodes #29 and #57 were observed, in association with a loss of CD127 expression. This latter phenotype could be a feature of either activated effector CD4 T cells or regulatory T cells. None of these nodes had significant increased proportion in septic shock patients compared to healthy volunteers.

B cell commitment to plasma cell differentiation in septic shock patients. Finally, given the enrichment in B cell populations in septic shock patients, we went further in B cell study. We ran a viSNE analysis on all CD19⁺ cells from SPADE tree (Fig. 7). ViSNE is a well-established CyTOF analysis tool that displays high dimensional data on a two-dimensional map. Cells are plotted on a continuum of expression with phenotypically related cells clustered together, often manifesting as “islands”, which can be identified by colouring cells according to their expression of specific marker. A gap in island distribution between two conditions can indicate an altered cell type or phenotype. Here, viSNE maps from patients and controls did not show the same pattern, suggesting a reorganisation of B cell subpopulations after septic shock. To further investigate this observation, cells were coloured on viSNE plots according to cell surface expression of CD38 or CCR6, two markers of B cell differentiation¹³. We observed that, in both healthy donors and septic shock patients, CD38⁺ and CCR6⁺ cells did not present same location on the viSNE map, indicating that they belonged to different cell subtypes. Moreover, we could highlight an increase of CD38⁺ cells in septic patients, as well as a decrease of CCR6⁺ cells compared to healthy donors. These observations suggested a shift from B cells to plasma cell differentiation in septic shock patients.

Discussion

Exhaustive characterisation of sepsis-immune alterations has not been completed yet, limiting the identification of potential new specific targets of immunotherapies. In this study, we hypothesized that high dimensionality afforded by CyTOF could be a useful tool to detect novel and unexpected immune features in septic shock patients. To date, very few studies have used CyTOF technology to explore infectious diseases in clinical cohorts^{14–16} and none specifically in septic shock. So far, CyTOF has been more often employed as an exploration tool of *in vitro* models of infections^{17–19}. Here, we set up a proof of concept study with a mass cytometry panel of 25 markers, in order to compare immune phenotype of mononuclear cells from septic shock patients and healthy volunteers.

CyTOF represents a powerful high dimensional single-cell analysis technique that overcomes major limitations of flow cytometry. In particular, through the use of antibodies coupled to rare elemental metal isotopes, mass cytometry can detect discrete isotope peaks without significant overlap. This significantly ameliorates the need for compensation, a major limiting factor of flow cytometry. In addition, mass cytometry has no “autofluorescence” equivalent. This limits the loss of resolution that could be observed in flow cytometry because of high background level, thus making data analysis easier. Finally, signal intensity is more homogeneous with isotopes than fluorochromes, which sometimes show important brightness differences between the highest and dimmest, complicating panel design. This leads to higher multiplexing capability and easier panel design in CyTOF than in flow cytometry, enabling simultaneous measurement of several tens of markers. Thus, CyTOF appears more appropriate than conventional flow cytometry to take over high dimensional data analysis.

However, cell loss during freezing steps and CyTOF acquisition, high amount of cells needed, low throughput and complex high dimensional data analysis are many hurdles that might prevent the use of CyTOF in clinical studies of patients with septic shock⁷. Here, we show that pre-analytical process did not lead to any specific cell subset depletion among mononuclear cells and that final cell number was adequate for a relevant mass cytometry analysis. Moreover, reliability of our data was validated by non-supervised approaches used throughout the pipeline analysis. First, expression of lineage and differentiation markers clustered SPADE nodes in coherent distinct leukocyte subsets leading to identification of cell types corresponding to each node. Then, non-supervised approaches were able to highlight some established hallmarks of septic shock immune alterations. Particularly, in septic shock patients we observed a decreased expression of HLA-DR on monocytes²⁰, an increase of CD14⁺ HLA-DR^{low} monocyte proportions²¹ and an overexpression of PD1 and PD-L1 on CD4 T cells and monocytes respectively²².

As hypothesised, CyTOF single cell data analysis allowed discrimination of many cell subsets, enabling to study specific rare populations and to highlight new features of sepsis-induced immunosuppression. First, a global approach on all SPADE nodes led to the identification of particular leukocyte subpopulations with modifications of their proportion after septic shock. These changes would have probably been missed with bulk analysis considering low abundance of the cell populations described. For example, we noted an increased proportion of CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD16⁺CD56⁻ cells in septic shock patients. This population could represent an interesting subtype of CD56 negative NK cells, described as an aberrant functionally altered NK subset, as they present with low capacity of proliferation, cytokine secretion, degranulation and expression of activation receptors. They were observed with elevated levels in individuals chronically infected with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) and hepatitis C virus (HCV)²³ but, to our knowledge, never described in septic shock. While this NK population could be of interest in sepsis-induced immunosuppression physiopathology, we cannot exclude the possibility that these cells represent some immature granulocytes frequently observed in septic shock patients' samples. As our mass cytometry panel did not contain markers dedicated to granulocyte characterization, we were not able to discriminate the two hypotheses, which now deserve to be further studied in septic shock patients. We also noted a trend toward B cell enrichment among mononuclear cells in septic shock patients, which had been very recently described by standard flow cytometry²⁴.

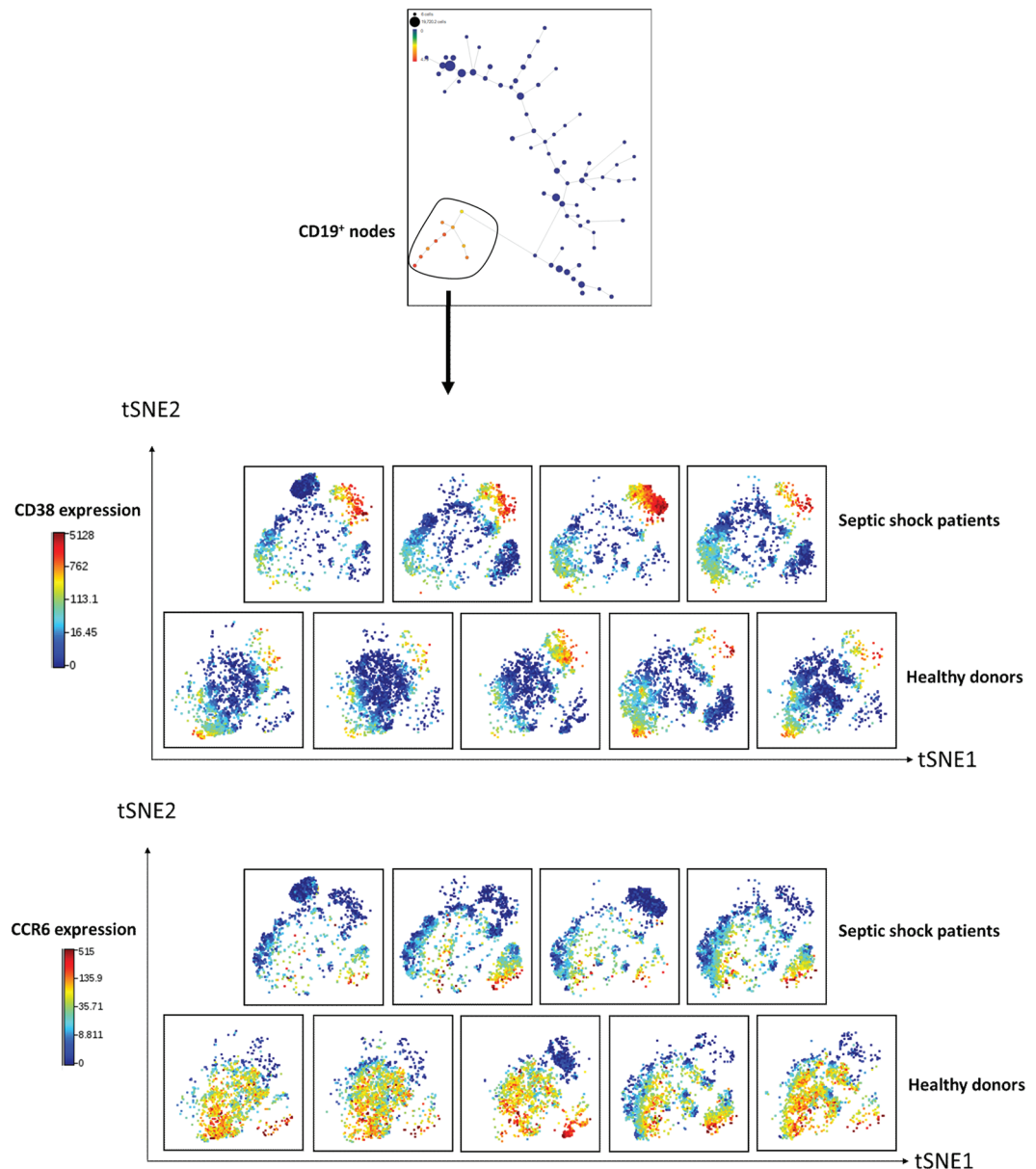


Figure 7. B cells shift towards plasma differentiation after septic shock. Cells from the 10 CD19⁺ nodes from SPADE tree (red nodes) were selected before clustering with the viSNE algorithm. Individual viSNE plots are shown for septic patients (n = 4) and healthy donors (n = 5). ViSNE is a visualization tool based on the t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) algorithm. ViSNE establishes the two dimensional representation of single-cell data sets that best preserves their respective local and global geometry. ViSNE plots represent individual cells in a visual similar to a scatter plot, while using all pairwise distances in high dimension to determine each cell's location in the plot. tSNE algorithm provided each cell with a unique x- and y-coordinate (tSNE1 and tSNE2) according to each cell's expression of 19 parameters of the CyTOF panel. The relative positions of cells on the two-dimensional plot thus reflect their similarity in terms of expression pattern for the 19 parameters included in the panel. In the current analysis, we used color as a third dimension to visualize specific markers expression levels on each cluster. B cell expressions of CD38 and CCR6 are shown on the figure. Red color intensity represents high expression level of the indicated marker. Blue color intensity represents low expression level of the indicated marker. Plots were visually compared between septic patients and controls to highlight differences in marker intensity and cellular distribution.

Then, we studied changes in cellular phenotypes after septic shock through more specific approaches. First, we focused on monocyte SPADE nodes. Remarkably, among the 9 markers used in the heatmap analysis, unsupervised clustering highlighted an immune signature of 4 markers (HLA-DR, CD4, CD38 and PD-L1) differentially expressed in healthy volunteers and septic shock patients. This uniform response might be used as potential biomarker of sepsis outcomes and then should be confronted to clinical recovery in larger cohorts, e.g. development of hospital acquired infection or mortality. Next, we were interested in the characterisation of CD4 T cell nodes

expressing PD1, as many novel immunostimulating therapies target this molecule. Increase of PD1 expression did not occur on all CD4 T cell subsets after septic shock. Interestingly, CD4 T cells exhibiting PD1 upregulation did not coexpress other immune checkpoint inhibitors Tim-3 and PD-L1. Furthermore, increased expression of PD1 was observed on CD4 T cells presenting with different activation status, as some PD1⁺ cells clearly exhibited activated phenotypes whereas some corresponded to resting memory T cells. Here, CyTOF revealed to be a powerful tool to highlight and study cellular heterogeneity, as demonstrated recently for exhausted CD8 T cells in other clinical contexts¹⁶. In particular, our results imply that exhaustion phenomenon might not occur in all cell subsets after septic shock, or at least might not be systematically associated with PD1 overexpression. These observations should be kept in mind and further explored when considering anti-PD1 strategy to treat septic patients. They strengthen the need of developing biomarkers of patients' immune status before using immunotherapies. Finally, when focusing on CD19⁺ cells, we observed a shift of B cell subsets towards plasma cell differentiation after septic shock. Thus we confirmed a feature of sepsis described recently for the first time by our group²⁴. It was striking to be able to detect this phenomenon in such a small cohort.

The aim of the present study was to assess feasibility and opportunities provided by CyTOF use in sepsis clinical cohorts. Thus, by nature, as a proof of concept study, our work has some limitations. In particular, we included small numbers of HV and septic shock patients. However, even in such a small cohort, non-supervised analyses of high dimensional data strikingly succeeded in highlighting both well-established (*e.g.*, low mHLA-DR) and novel characteristics (*e.g.*, increased plasma cells) of sepsis-induced immunosuppression. This illustrates the power of CyTOF technology. Furthermore, CyTOF was able to identify one septic patient with a singular immune pattern compared to others. This was confirmed by unusually high mHLA-DR expression measured by traditional flow cytometry. Again, this exemplifies CyTOF capacity to detect heterogeneity within septic shock patients' immune patterns. Thus, upon analysis of larger cohorts, CyTOF could be relevant to reveal new features of sepsis pathophysiology on the one hand, and to stratify patients according to their immune status and trajectories over time on the other hand. This latter point is an absolute requirement in future studies evaluating immunomodulating therapies in clinical cohorts. Analysing data from more patients would also open the possibility to use new interesting algorithms and software tools, as Citrus, which are able to automatically identify immune signatures in cellular populations^{12,25}.

Beyond the present study, there are several limiting factors for mass cytometry implementation in clinical studies. Indeed, CyTOF is a time consuming method, requiring 3 days of experiment from freezing to data acquisition. High dimensional data leads to days of data analysis, involving innovative bioinformatics tools such as SPADE and viSNE and representing analytical challenge for non-experts. However, mass cytometry represents a powerful tool to characterize immune alterations and observe the individual variability that must be targeted when developing immunomodulating therapies in context of personalised medicine. This has been illustrated in trauma context, where mass cytometry was used to link single-cell profiling of immunologic states to post-traumatic outcomes²⁶, or in cancer context, revealing specific markers associated with melanoma immunotherapy response²⁷. CyTOF could be relevant to highlight such immune signatures in sepsis.

In conclusion, in this study, we paved the way to the use of mass cytometry in sepsis clinical studies by demonstrating its reliability and feasibility in this context. We must now consider the use of standardized protocols on whole blood samples^{28–30} that would allow the use of this technology in multicentre studies. In addition, these preliminary results now deserve to be completed by larger studies combining extra and intracellular markers to explore signalling pathways and transcription factors, in order to progress in exhaustive characterisation of sepsis-induced immunosuppression.

Patients and Methods

Study population. This clinical study was conducted on septic shock patients admitted to the ICU of Edouard Herriot Hospital (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France). This project is part of a global study on ICU-induced immune dysfunctions. It has been approved by our Institutional Review Board for ethics ("Comité de Protection des Personnes Sud-Est II"), which waived the need for written informed consent since this study was observational with low risk for the patients and no specific blood sampling procedure beside routine blood sampling was required (#IRB 11236). This study is also registered at the French Ministry of Research and Teaching (#DC-2008-509) and recorded at the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés. Oral information and non-opposition to inclusion in the study were mandatory and recorded in patients' clinical files. This study is registered at NCT02803346.

Septic shock patients were identified according to the diagnostic criteria of the 1992 consensus definitions of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine³¹. Patients were excluded if under 18 years of age or presented with aplasia or pre-existent immunosuppression. Septic shock diagnosis was based on the combination of an identifiable site of infection with persisting hypotension — despite fluid resuscitation — and evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: a) temperature >38 °C or <36 °C; (b) heart rate >90 beats/min; (c) respiratory rate >20 breaths/min; (d) white blood cell count >12,000/mm³ or <4,000/mm³. The onset of septic shock was defined by the beginning of vasopressor therapy.

Peripheral blood was collected in patients 3 days after the onset of septic shock during routine blood sampling procedure, since previous studies showed that this time-point corresponds to the nadir of sepsis-induced immunosuppression⁵. Clinical and biological parameters were collected, including demographic characteristics, date and cause of ICU admission, status at day 28 after inclusion, type of infection, comorbidities allowing to calculate Charlson comorbidity index³². Severity scores were recorded: the Simplified Acute Physiology Score II (SAPSII; range 0–194)³³ and the Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA; range 0–24)³⁴.

Concomitantly, healthy volunteers were obtained from the blood bank Etablissement Français du Sang (EFS) in Lyon, France. According to EFS standardized procedures for blood donation, informed consent was obtained from healthy donors and personal data were anonymized at the time of blood donation and before the transfer of blood to the research lab.

Sample preparation. PBMC from septic patients and healthy volunteers were isolated from 7 mL of blood freshly drawn on anticoagulated tubes with Lympholyte[®]-H Cell Separation Media (Cedarlane, Burlington, Canada) centrifugation. PBMC were immediately cryoconserved after isolation in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI) complemented with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and glutamine (Eurobio Abcys, Courtaboeuf, France) containing 40% AB human serum (SAB) and 10% dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO).

Mass cytometry. Depending on the sample, between 0.5 and 2.5 million thawed PBMC were incubated during 5 min with a viability reagent (5 μ mol/L Cell-ID[™] Cisplatin; Fluidigm, South San Francisco, CA) and then washed twice in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) containing 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA). For staining, cells were incubated for 40 min at 4 °C in 100 μ L DPBS/0.1% BSA containing antibody cocktail prepared with 25 antibodies listed in Supplementary Table S3. Pre-metal tagged antibodies were purchased from Fluidigm. Cells were washed twice in DPBS/0.1% BSA and then fixed overnight at 4 °C with 1 mL of MaxPar[®] Fix&Perm Buffer (Fluidigm) containing 1 μ L of Cell-ID[™] Intercalator-Ir 125 μ M (Fluidigm). The following day, cells were washed twice with DPBS and finally once with deionized MaxPar[®] Water (Fluidigm). Cells were resuspended in 1 $\times$ EQ Four Element Calibration Beads (Fluidigm Sciences) according to the manufacturer's instructions. Samples were collected on a Helios mass cytometer (Fluidigm). Events were normalized prior to analysis as described elsewhere³⁵. Normalized data were imported into Cytobank (Santa Clara, CA) and manually gated: first, singlets were identified as ¹⁹¹Ir⁺ ¹⁹³Ir⁺ events and then viable cells as ¹⁹⁵Pt negative events. Eventually, normalization beads were excluded by gating on 140Ce negative events (see Supplementary Fig. S2A). To analyse proportions of main PBMCs' populations, cells were first gated according to their expression of CD3. CD4 and CD8 T cells were identified within CD3⁺ cells, while CD19⁺, CD14⁺ and CD16⁺/CD56⁺ non-T cells were used to classify B cells, monocytes and NK cells respectively (see Supplementary Fig. S2B). When studying individual expression of phenotypic markers, we used a mass-minus-one control to set positive threshold. It was constituted of thawed PBMC stained only with lineage markers CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD16 and CD56.

Flow cytometry. Proportions of CD4 and CD8 T cells, as well as monocytes in PBMC were determined by flow cytometry using a four-color monoclonal antibody panel consisting of CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, Hialeah, FL). A second antibody panel was used to measure B cells and NK cells' proportions, using CD19-PB/CD3-FITC/CD16-CD56-PE/CD45-APC-AF750 (Beckman Coulter). Samples were run on a Navios flow cytometer (Beckman coulter). Listmodes were subsequently analysed using Kaluza software (Version 1.2). Briefly, in both panels, lymphocytes were first gated out of total events on a biparametric CD45/SSC dot-plot, as CD45^{hi} SSC^{lo} events. Then, T cell subpopulations were defined as CD4⁺ or CD8⁺ CD3⁺ lymphocytes while B and NK lymphocytes were characterized as CD3 negative cells expressing respectively CD19 and CD56/CD16.

Data processing and analysis pipeline. The whole analysis pipeline is illustrated in Fig. 2.

X-shift. The 06/29/2017 version of Vortex was downloaded and manually gated singlet viable events from the 5 healthy donors and 5 septic shock samples were uploaded into the Vortex clustering environment³⁶. The imported settings described previously were used¹²: minimal Euclidean length of the profile: 1.0, import maximum: 10,000 events, and merge all files into one dataset. All 24 parameters were selected for clustering. After the data were imported, the following clustering settings were used: numerical transformation: arcsinh (x/f), f = 5.0, noise threshold: 1.0, feature rescaling: none, normalization: none, distance measure: angular distance, clustering algorithm: X-shift (gradient assignment), density estimate: N nearest neighbors (fast), number of neighbors for density estimate (K): from 150 to 5, with 30 steps, and number of neighbors for mode finding (N): determine automatically. Following clustering, the elbow point for cluster number was calculated as K = 35, which corresponded to 78X-shift-defined clusters within the dataset.

Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events. SPADE analysis was performed on manually gated singlet viable events from the 5 healthy volunteers and 5 septic shock samples on Cytobank. Raw median intensity values were transformed to a hyperbolic arcsine (arcsinh) scale with a cofactor of 5. The target number of nodes was adjusted to 78 as defined with the X-shift clustering tool. Clustering channels included all 25 parameters except for CD138, because of elemental contamination in 2 samples. Percentage downsampling was 10%. SPADE trees for each individual across all 24 markers were downloaded from Cytobank. Intensity and cellular abundance of each node from each individual were exported for further analysis.

Visual Stochastic Network Embedding. All CD19⁺ nodes from SPADE tree were selected and subjected to viSNE analysis. Non-B lineage markers as well as CD138 were excluded from viSNE clustering. Equal event sampling was selected to allow comparison between individuals, using the lowest common denominator across samples, which was 3055 events. Other viSNE settings were applied: number of iterations 2000, perplexity 30, theta 0.5. Cellular phenotype was studied visualizing characteristic markers' distribution and expression on viSNE plots and through generation of overlays on Cytobank.

Determination of node frequency variations between patients and controls. To select nodes with important variations in cell proportions between healthy donors and septic patients, nodes were ranked in each group by descending order according to their average proportions. A rank difference (control - septic patient ranks) under 0 reflected a decrease of cell proportion in septic patients, whereas a positive difference suggested an increased proportion in septic patients compared to healthy donors. Nodes with proportion variations differing of more

than one tertile of total node ranks were selected and individual frequencies were compared between septic shock patients and healthy donors with appropriate statistical test.

Statistical analysis. Statistical analyses, heatmaps and graphics exploring cellular abundance and expression were performed on RStudio software. Non-parametric Mann-Whitney tests were used to compare data between septic shock patients and controls. Non-parametric Wilcoxon paired test was used when comparison within the same sample was performed. Values from continuous variables are presented as medians with Q1-Q3 interquartile ranges [IQR] between brackets. p value < 0.05 was considered as significant.

References

1. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
2. Reinhart, K. *et al.* Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* (2017).
3. Vincent, J. L. *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* **34**, 344–353 (2006).
4. Shankar-Hari, M. *et al.* 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 (2016).
5. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* **13**, 260–268 (2013).
6. Francois, B. *et al.* Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* **3** (2018).
7. Herderschee, J., Fenwick, C., Pantaleo, G., Roger, T. & Calandra, T. Emerging single-cell technologies in immunology. *J Leukoc Biol* **98**, 23–32 (2015).
8. Davis, M. M. & Brodin, P. Rebooting Human Immunology. *Annu Rev Immunol* **36**, 843–864 (2018).
9. Simoni, Y., Chng, M. H. Y., Li, S., Fehlings, M. & Newell, E. W. Mass cytometry: a powerful tool for dissecting the immune landscape. *Curr Opin Immunol* **51**, 187–196 (2018).
10. Qiu, P. *et al.* Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nat Biotechnol* **29**, 886–891 (2011).
11. Amir el, A. D. *et al.* viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* **31**, 545–552 (2013).
12. Kimball, A. K. *et al.* A Beginner's Guide to Analyzing and Visualizing Mass Cytometry Data. *J Immunol* **200**, 3–22 (2018).
13. Lee, A. Y. S., Bannan, J. L., Adams, M. J. & Korner, H. Expression of CCR6 on B cells in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol* **36**, 1453–1456 (2017).
14. Corneau, A. *et al.* Comprehensive MassCytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals. *Cytometry B Clin Cytom* **92**, 21–32 (2017).
15. Swadling, L. *et al.* A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci Transl Med* **6**, 261ra153 (2014).
16. Bengsch, B. *et al.* Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity* **48**, 1029–1045 e1025 (2018).
17. Sen, N., Mukherjee, G. & Arvin, A. M. Single cell mass cytometry reveals remodeling of human T cell phenotypes by varicella zoster virus. *Methods* **90**, 85–94 (2015).
18. Nair, N. *et al.* High-dimensional immune profiling of total and rotavirus VP6-specific intestinal and circulating B cells by mass cytometry. *Mucosal Immunol* **9**, 68–82 (2016).
19. Hamlin, R. E. *et al.* High-dimensional CyTOF analysis of dengue virus-infected human DCs reveals distinct viral signatures. *JCI Insight* **2** (2017).
20. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **13**, 862–874 (2013).
21. Venet, F. & Monneret, G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* **14**, 121–137 (2018).
22. Zhang, Y. *et al.* Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care* **15**, R70 (2011).
23. Bjorkstrom, N. K., Ljunggren, H. G. & Sandberg, J. K. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol* **31**, 401–406 (2010).
24. Gustave, C. A. *et al.* Septic Shock Shapes B Cell Response toward an Exhausted-like/Immunoregulatory Profile in Patients. *J Immunol* **200**, 2418–2425 (2018).
25. Bruggner, R. V., Bodenmiller, B., Dill, D. L., Tibshirani, R. J. & Nolan, G. P. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E2770–2777 (2014).
26. Seshadri, A. *et al.* Phenotyping the Immune Response to Trauma: A Multiparametric Systems Immunology Approach. *Crit Care Med* (2017).
27. Hogan, S. A., Levesque, M. P. & Cheng, P. F. Melanoma Immunotherapy: Next-Generation Biomarkers. *Front Oncol* **8**, 178 (2018).
28. Gaudilliere, B. *et al.* Clinical recovery from surgery correlates with single-cell immune signatures. *Sci Transl Med* **6**, 255ra131 (2014).
29. Fragiadakis, G. K. *et al.* Patient-specific Immune States before Surgery Are Strong Correlates of Surgical Recovery. *Anesthesiology* **123**, 1241–1255 (2015).
30. Aghaeepour, N. *et al.* Deep Immune Profiling of an Arginine-Enriched Nutritional Intervention in Patients Undergoing Surgery. *J Immunol* (2017).
31. Bone, R. C. *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* **101**, 1644–1655 (1992).
32. Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L. & MacKenzie, C. R. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* **40**, 373–383 (1987).
33. Le Gall, J. R., Lemeshow, S. & Saulnier, F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* **270**, 2957–2963 (1993).
34. Vincent, J. L. *et al.* Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* **26**, 1793–1800 (1998).
35. Finck, R. *et al.* Normalization of mass cytometry data with bead standards. *Cytometry A* **83**, 483–494 (2013).
36. Samusik, N., Good, Z., Spitzer, M. H., Davis, K. L. & Nolan, G. P. Automated mapping of phenotype space with single-cell data. *Nat Methods* **13**, 493–496 (2016).

Acknowledgements

The authors would like to thank Fayrouz Mehennaoui and Valérie Cerro from E. Herriot Hospital, for their valuable help in patient inclusion process of the Immunosepsis study. The authors also thank équipex PHENOCAN (ANR -11-EQPX-0035 PHNEOCAN).

Author Contributions

F.V., G.M. and M.G. conceived the study. T.R., S.D. and F.B. included patients in the cohort. M.G. and T.A. performed the experiments. M.G., C.M. and F.P.L. analysed the data. M.G. wrote the manuscript. F.V., G.M., F.P.L., C.M., T.R., S.D., F.B. and T.A. reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35932-0>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

**Deep immunophenotyping of sepsis-induced immune alterations by mass cytometry: proof
of concept in septic shock patients**

Morgane Gossez, PharmD*†, Thomas Rimmelé, MD PhD†‡, Thibault Andrieu§, Sophie Debord,
MD‡, Frédérique Bayle, MD‡, Christophe Malcus, PharmD PhD*, Françoise Poitevin-Later,
PharmD*, Guillaume Monneret, PharmD PhD*†, Fabienne Venet, PharmD PhD*†

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Table S1. Freezing and thawing protocols tested

Steps	Protocol 1	Protocol 2	Protocol 3	Protocol 4
Freezing medium (FM)	SAB + 20% DMSO	RPMI + 20% SAB + 20% DMSO	RPMI + ATB + 50% SAB + 10% DMSO	RPMI + 40% SAB + 10% DMSO
Freezing step	Add FM drop by drop in 1min			Add all FM volume at once
	- Cell concentration of $1.5 - 2 \times 10^6$ cells/ml - Dispense 1 ml cell suspension into cryovial - Immediately place cryovials into a freezing container (Mr Frosty) in a -80 °C freezer - On the following day, transfer the cryovials into standard freezer boxes			
Thawing medium (TM)	RPMI	RPMI + 10% SAB 37°C	SAB	RPMI + ATB + DNase 37°C
Thawing step	1 ml TM drop by drop - Qsp 10 mL TM 5 min resting 2 washs	1 mL TM drop by drop 10 min resting - Qsp 10 mL TM 2 washs	1 mL TM drop by drop 4 mL RPMI 5 min resting 2 washs	1 mL TM all at once - Qsp 10 mL TM 2 washs

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium complemented with hepes and glutamine; SAB: AB human serum; DMSO: Dimethylsulfoxyde; ATB: antibiotics including penicillin, streptomycin and amphotericin B. Freezing/thawing protocols presented in this paper are in-house protocols from several laboratories in Lyon (Etablissement Français du Sang – blood bank in Lyon; Immunology Laboratory of Edouard Herriot Hospital) and Oxford (Peter Medawar Building for Pathogen Research).

Supplementary Table S2. Clinical and biological data for septic shock patients

N = 5	
Male	4 (80)
Age (year)	70 [67-73]
SAPSII score	55 [49-61]
SOFA score	9 [7-9]
Charlson score	2 [0-3]
Type of admission	
Medical	4 (80)
Emergency surgery	1 (20)
Type of infection	
Community acquired	2 (40)
Nosocomial	3 (60)
Site of infection	
Pulmonary and respiratory	1 (20)
Gastro and intra-abdominal	1 (20)
Urinary	2 (40)
Surgical site	1 (20)
Documentation of infection	
Clinics + surgery	1 (20)
Microbiologically documented	4 (80)
<i>BGN</i>	3 (60)
<i>CGP</i>	1 (20)
Immune parameters at day 3	
mHLA-DR (AB/C)	9,292 [7,219-9,716]
CD4 T cells (cells/ μ L)	634 [536-750]
Tregs (% among CD4 T cells)	7.4 [5.3-9.0]

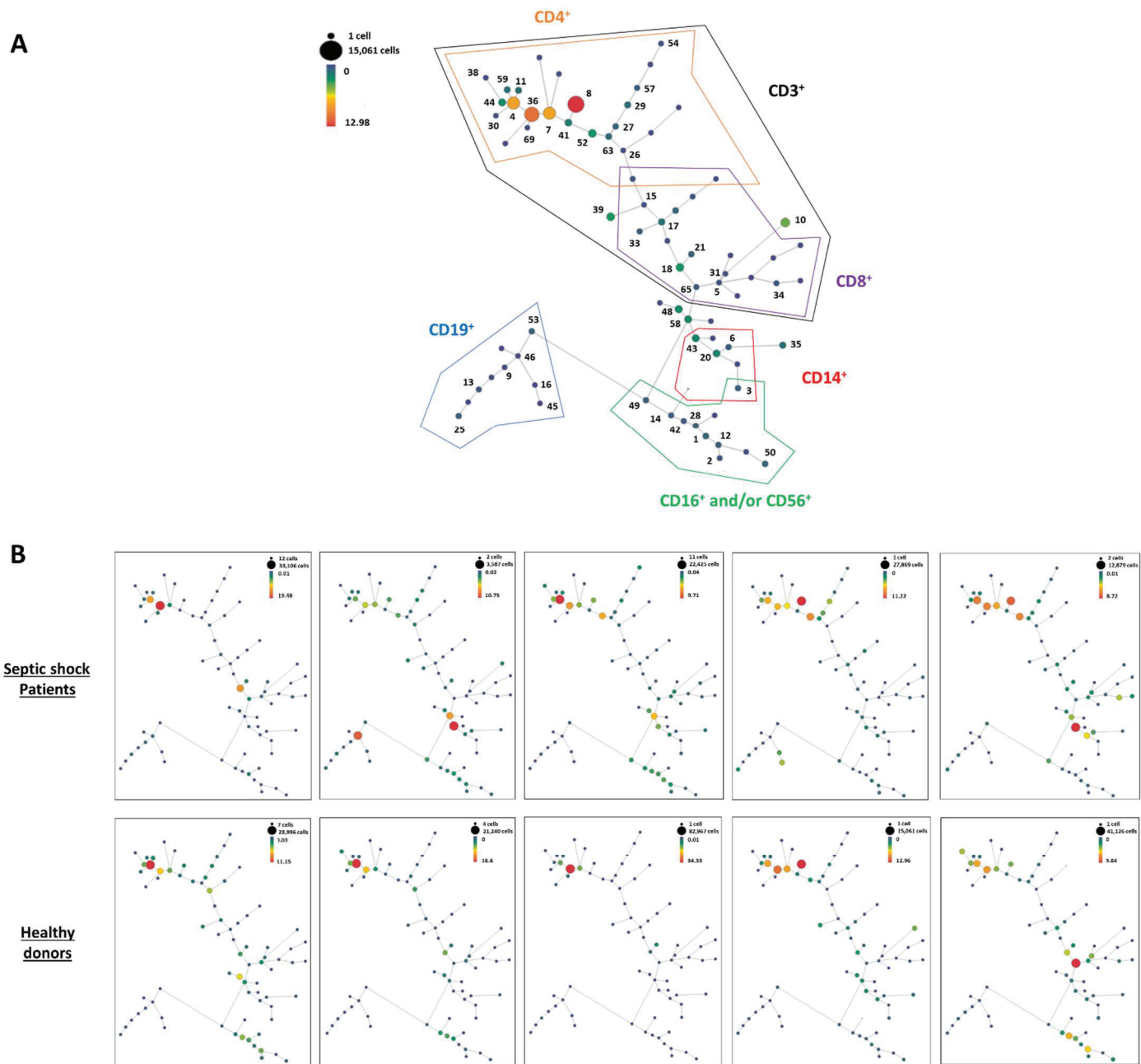
Five septic shock patients were included in this study. Values are presented as numbers (percentages) for categorical variables and as medians and [Q1-Q3] interquartile ranges for continuous variables. SAPSII: Simplified Acute Physiological Score II. SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment score. BGN: Bacilli Gram Negative. CGP: Cocci Gram Positive. mHLA-DR: cell surface expression of HLA-DR on circulating monocytes. AB/C: number of antibodies bound per cell. Tregs: regulatory T cells. Normal value for mHLA-DR is > 15,000 AB/C, indicative of immunocompetence (1). In-laboratory age-matched values for CD4 T cell absolute count are 336–1126 cells/ μ L and 4–10% of total CD4 T cells for Tregs.

*Serum lactate level was not measured at admission for one patient.

Supplementary Table S3. Mass cytometry antibody panel

Elemental Isotope	Antigen Target (Human)	Clone number
141Pr	CD196 (CCR6)	G034E3
143Nd	CD45RA	DX29
145Nd	CD4	RPA-T4
146Nd	IgD	IA6-2
148Nd	CD14	RMO52
149Sm	CD56 (NCAM)	NCAM16.2
150Nd	CD138	DL-101
152Sm	TCR $\gamma\delta$	11F2
153Eu	TIM-3	F38-2E2
154Sm	CD3	UCHT1
155Gd	CD279 (PD-1)	EH12.2H7
156Gd	CD183 (CXCR3)	G025H7
158Gd	CD27	L128
159Tb	CD197 (CCR7)	G043H7
160Gd	CD28	CD28.2
162Dy	CD8a	RPA-T8
165Ho	CD19	HIB19
167Er	CD223 (LAG-3)	3DS223H
168Er	CD154 (CD40L)	24-31
169Tm	CD25 (IL-2R)	2A3
172Yb	CD38	HIT2
173Yb	HLA-DR	L243
175Lu	CD274 (PD-L1)	29E.2A3
176Yb	CD127 (IL-7Ra)	A019D5
209Bi	CD16	3G8

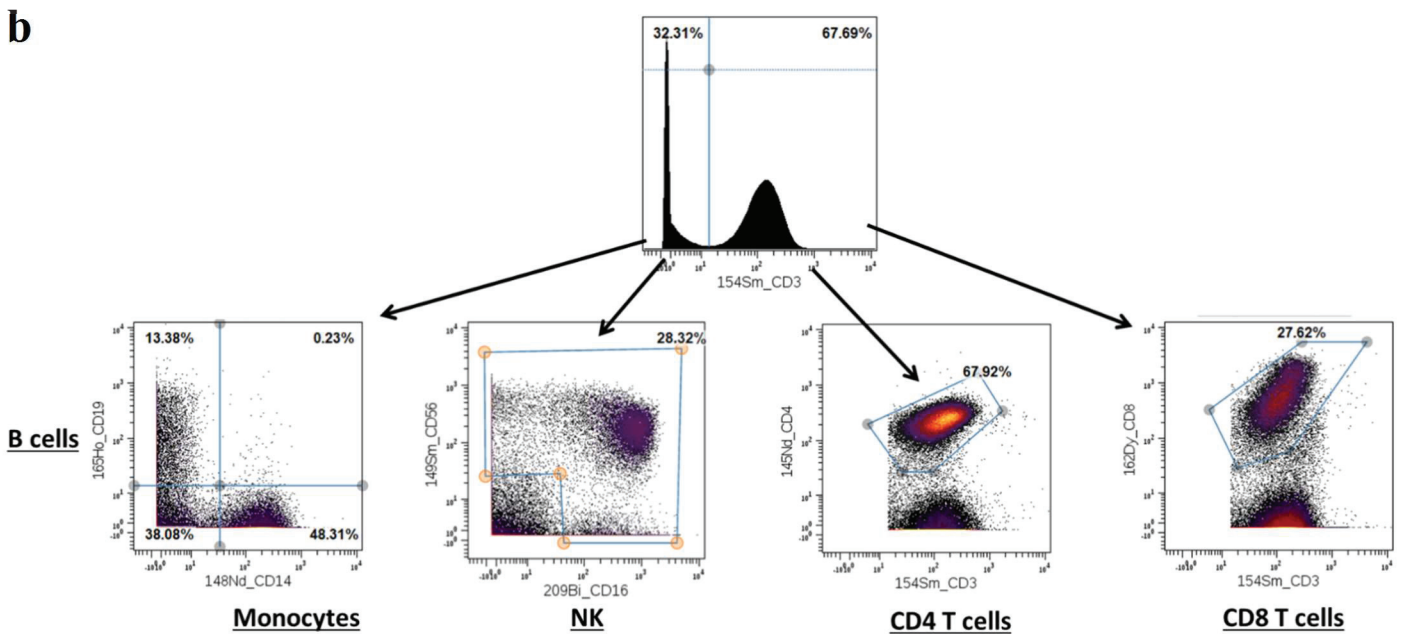
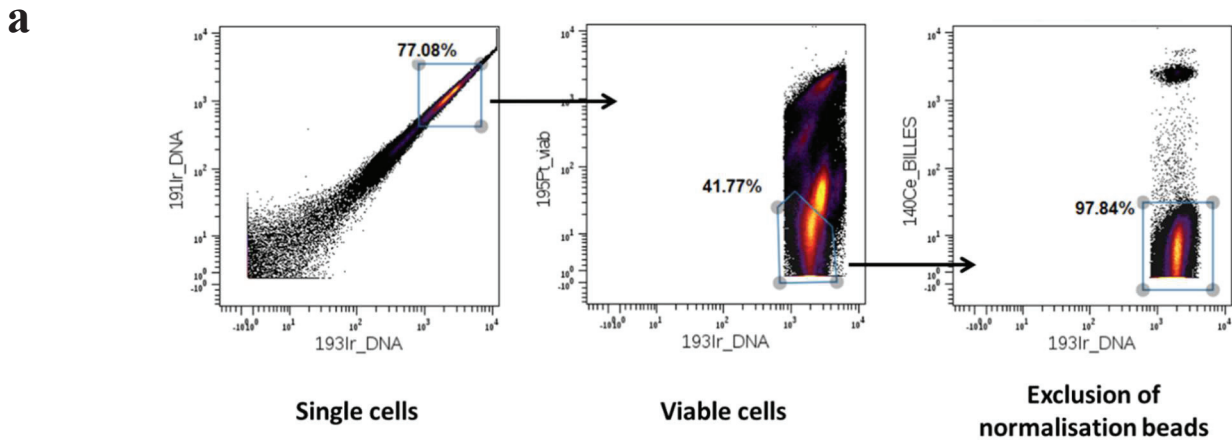
Pre-metal tagged antibodies were purchased from Fluidigm. Antibodies were used at final concentration of 1:100.



Supplementary Figure S1. SPADE trees

(A) Viable cells were parsed with SPADE into 78 nodes according to optimal clustering number determined with X-shift algorithm. 10% down-sampling was performed. All markers were used for clustering. Only nodes with an average proportion $\geq 0.5\%$ of total cells (numbered nodes) were selected for further analysis in order to exclude sparse clusters in which low cell numbers could potentially increase the error of reported medians. Lineage marker expression was highlighted on each node, allowing identification of leukocyte subpopulations. (B) SPADE trees are shown for the 5 healthy donors and 5 septic shock patients. Node size represents cell number and node color is associated with the proportion among all cells from the sample.

Thus, cell abundance differences between samples can be visually noted.



Supplementary Figure S2. Gating strategy for CyTOF analysis

(A) After CyTOF analysis, events were selected as followed: singlets were identified as $^{191}\text{Ir}^+ \text{ } ^{193}\text{Ir}^+$ events; then viable cells as ^{195}Pt negative events; finally normalization beads were excluded by gating on ^{140}Ce negative events. (B) For PBMC subpopulations analysis, cells were first gated according to their expression of CD3. CD4 and CD8 T cells were identified within CD3^+ cells, while CD19^+ , CD14^+ and $\text{CD16}^+/\text{CD56}^+$ non-T cells were used to classify B cells, monocytes and NK cells respectively.

ARTICLE 3 : MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DE CELLULES B REGULATRICES AU COURS DE L'IMMUNODEPRESSION INDUITE PAR LE SEPSIS

(Article en préparation)

A. Contexte et objectif

Les données présentées dans les deux premières études de cette thèse suggèrent l'apparition de lymphocytes B/plasmocytes présentant d'éventuelles propriétés immunorégulatrices lors de la phase d'immunodépression du choc septique. Compte tenu de la description de lymphocytes B régulateurs dans divers contextes cliniques et de leur rôle dans des modèles animaux d'infection, nous avons fait l'hypothèse que des Bregs pouvaient participer à l'immunodépression induite par le sepsis. ***Ainsi, l'objectif du travail présenté dans cette dernière partie de thèse est d'explorer les propriétés immunorégulatrices des lymphocytes B/plasmocytes lors de la phase d'immunodépression post-septique, d'en comprendre les mécanismes et d'évaluer leur rôle dans la physiopathologie du sepsis.***

Ce projet plus mécanistique et fondamental que les deux études précédentes n'était pas envisageable à partir des échantillons biologiques issus de patients en choc septique. En effet, seuls quelques millilitres de sang périphérique sont à notre disposition pour chaque patient, le sepsis entraîne une lymphopénie B et les lymphocytes B constituent une population minoritaire parmi les leucocytes circulants. Ainsi, afin de réaliser cette étude, nous avons mis en place un modèle murin d'immunodépression induite par le sepsis, reproduisant les principales altérations de l'immunodépression induite par le sepsis décrites chez l'homme et se rapprochant au maximum de la prise en charge clinique des patients en choc septique. Une fois ce modèle murin validé, nous avons exploré notre hypothèse du développement de cellules B immunorégulatrices au cours du sepsis. Enfin, les résultats observés dans le modèle murin ont été confirmés chez les patients. Ce type de démarche est appelée « recherche translationnelle inversée »³¹⁰ (Fig.32).

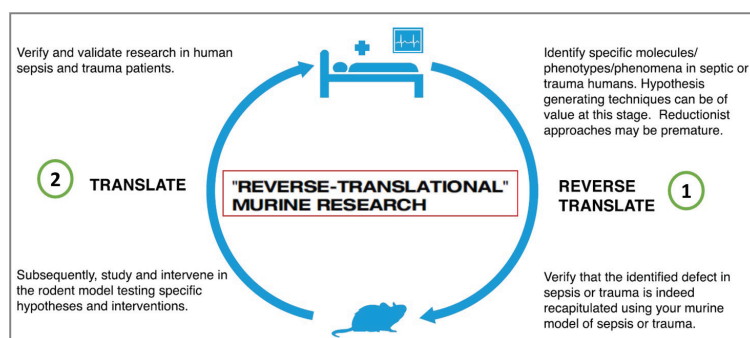


Figure 32. Principe de la recherche translationnelle inversée³¹⁰

Ce travail n'est pas achevé. Quelques données complémentaires sont nécessaires à la finalisation de l'étude en vue de la publication. Les résultats présentés ci-après sont un point d'étape.

B. Mise en place d'un modèle murin d'immunodépression induite par le sepsis

1) Présentation du modèle murin

Il existe plusieurs modèles précliniques murins de sepsis décrits dans la littérature (**Tableau 8**). Chacun de ces modèles possède différents avantages et inconvénients en termes de simplicité technique, de standardisation et de reproductibilité ³¹¹. De plus, certains modèles ne reproduisent pas les situations cliniques et facteurs menant au développement du sepsis chez l'homme (**Tableau 8**).

Tableau 8. Modèles murins expérimentaux de sepsis et leurs équivalents cliniques ³¹²

Models	Techniques	Clinical Analogues
LPS injection	Injection of LPS into the peritoneal cavity or bloodstream	None, although it may resemble fulminant meningococemia in some cases
Bacterial injection	Injection of bacteria in the peritoneal cavity or bloodstream	None. Lacks the constant source of bacteria characteristic of human sepsis and instead administers a single bolus
Cecal slurry	Injection of a standard amount of donor mouse cecal contents into the peritoneal cavity	Perforated viscus, although it lacks a continuous source of contamination
Cecal ligation and puncture	Ligation of a specified portion of the cecum, then cecal puncture and extrusion of contents	Perforated diverticulitis or appendicitis with abscess formation
Colon ascendens stent peritonitis	Insertion of a stent into the ascending colon with continuous flow of stool into the abdomen	Freely perforated viscus
Pneumonia	Intratracheal injection or inhalation of a bacterial inoculum	Pneumonia
Urosepsis	Intravesical injection of a bacteria inoculum	Urosepsis from ascending urinary tract infection

LPS = lipopolysaccharide.

Ainsi, nous avons choisi de mettre en place un modèle murin de sepsis induit par ligature et ponction caecale (CLP). En effet ce modèle est reproductible entre chaque expérience et s'approche au plus près de la situation clinique chez l'homme, mimant une péritonite avec perforation intestinale. Les modèles utilisant la CLP sont généralement graves, induisant un fort taux de mortalité, et utilisés principalement pour étudier la phase précoce du sepsis. Nous avons donc mis au point un protocole de CLP engendrant une faible mortalité dans les 48h après l'induction du sepsis et nous permettant ainsi d'étudier l'immunodépression induite par le sepsis. Nous avons également instauré une prise en charge des animaux la plus proche possible de celle des patients, en termes d'antibiothérapie et d'analgésie utilisés notamment. Le protocole du modèle CLP est décrit sur la **figure 33**.

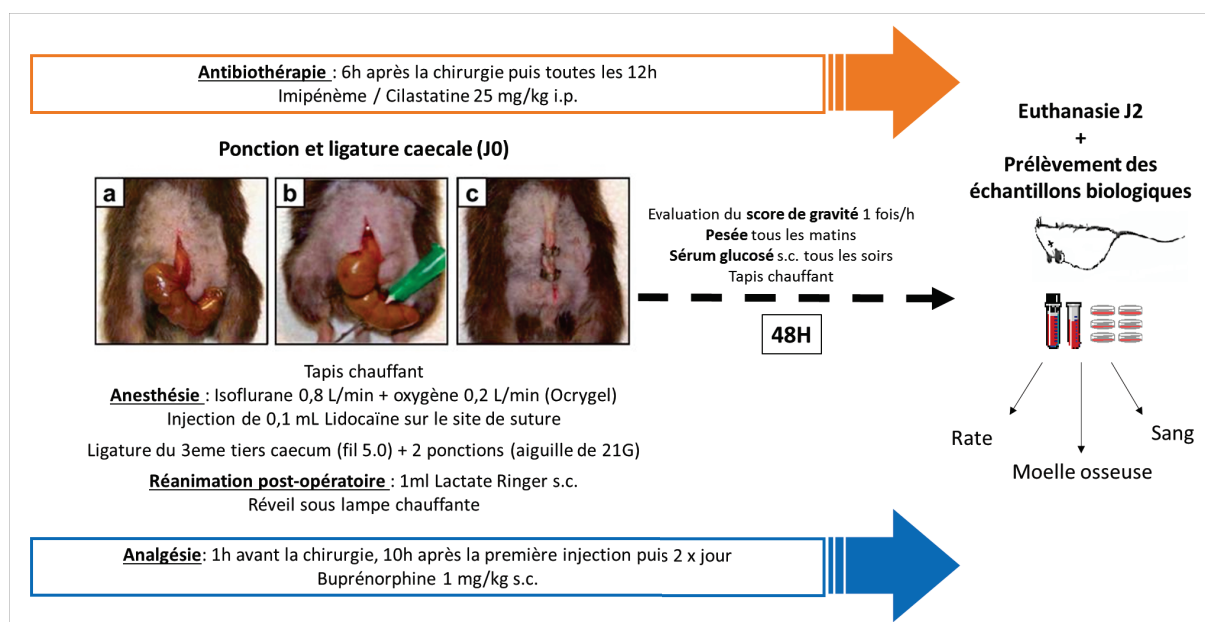


Figure 33. Protocole du modèle murin d'immunodépression induit par le sepsis

Les souris utilisées dans le modèle sont des souris C57BL/6, âgées de 8 à 10 semaines et pesant entre 20 et 30g. Ce sont des mâles, afin d'éviter l'effet éventuel du cycle hormonal sur l'immunité et les conséquences du sepsis. A chaque expérience, 5 souris sont étudiées : 3 souris subissant la CLP (« souris CLP ») et 2 souris contrôles (« souris SHAM »), chez qui le caecum est sorti hors de la cavité péritonéale lors de la chirurgie mais ne reçoit ni ponction ni ligature. Ceci permet de s'affranchir de l'effet de la chirurgie et de pouvoir considérer que les altérations immunitaires observées entre souris CLP et SHAM sont liées uniquement au sepsis. L'évaluation du score de gravité est basée sur le suivi du poids, de l'état général et de l'activité motrice, comme décrit dans le **tableau 9**. Pour un score entre 5 et 9, une injection supplémentaire de buprénorphine et/ou de sérum glucosé peut être réalisée. Dans ce cas, toutes les souris reçoivent le même traitement, indépendamment de leur état. Un score > 9 est considéré comme le point limite de souffrance acceptable, et dans ce cas l'animal est alors mis à mort avant la fin de l'expérience.

Tableau 9. Critères d'évaluation du score de gravité

Critère clinique				
Aspect de la fourrure	Toilettage actif	Toilettage sommaire	Poil terne ou hérissé	Pilo-érection
Activité motrice	Normale	Réduite mais réactive	Réduite quand stimulé	Absence d'activité
Posture	Normale	Dos vouté	Prostrée avec mouvements libres	Prostrée avec absence de mouvement, vrilles du corps
Respiration	Normale	Normale	Modérément dyspnéique	Dyspnée sévère
Perte de poids	0-5%	5-10%	10-15%	>15%
Score pour chaque item	0	1	2	3

Cette étude a été validée par le comité d'éthique en expérimentation animale de la Région Rhône-Alpes (CEEA-55) le 4 octobre 2016 (Protocole n°DR2016-32v2). Le modèle murin

d'immunodépression induite par le sepsis a été mis en place au sein du Service Commun des Animaleries de Rockefeller (SCAR) dirigé par le Pr Charles DUMONTET, en collaboration avec Mme Alexandra Vandermoeten qui réalise les chirurgies.

2) Validation du modèle d'immunodépression induite par le sepsis

a) Paramètres cliniques

Le suivi du poids des souris (**Fig.34A**) ainsi que du score de gravité (**Fig.34B**) pendant les 2 jours après chirurgie nous permet de contrôler qu'il existe un impact clinique du sepsis chez les souris CLP par rapport aux souris SHAM. Les souris SHAM perdent significativement du poids pendant les 24 premières heures après la chirurgie, puis se stabilisent. Au contraire, les souris CLP continuent à perdre du poids après 24h. On observe une perte moyenne de 10,7% de leur poids initial au bout de 48h *versus* 4,8% chez les souris SHAM. Le score de gravité des souris SHAM oscille entre 0 et 1, *i.e.* un comportement quasi normal. Au contraire, les souris CLP voient leur état se dégrader progressivement au fil du temps, pour atteindre un score moyen de 5 au bout de 48h. La mortalité à 48h est inférieure à 10% (**Fig.34C**).

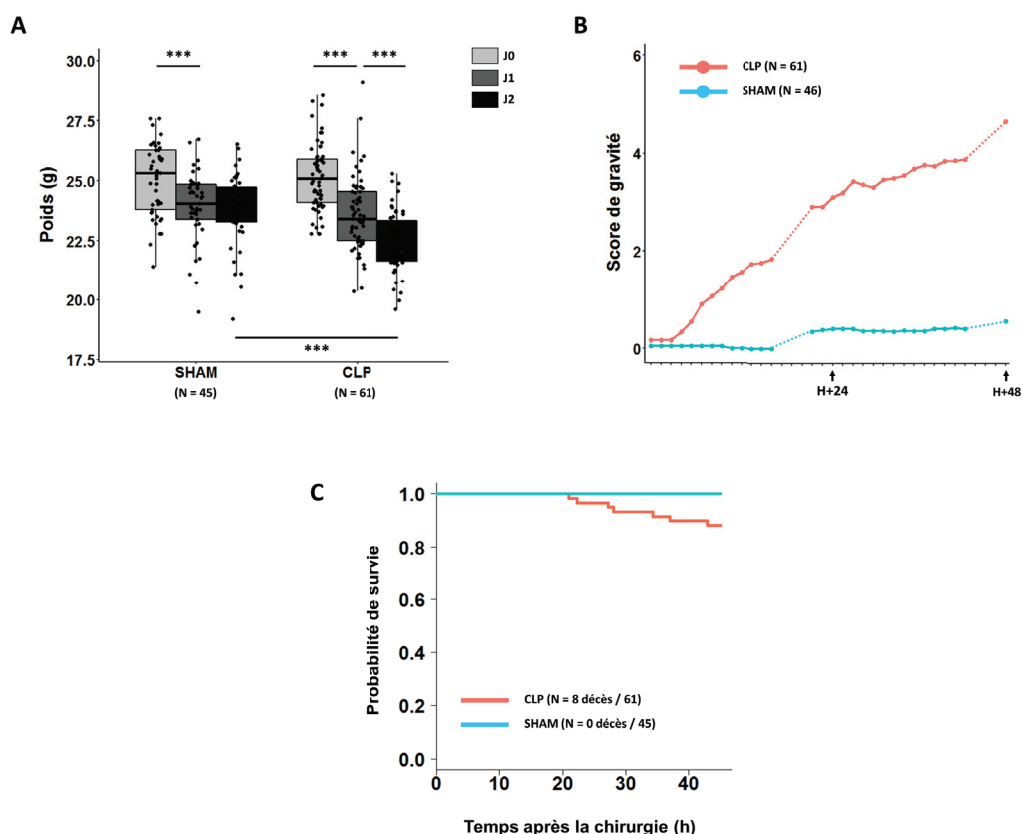


Figure 34. Suivi du poids, score de gravité et mortalité après la chirurgie

(A) Les souris sont pesées juste avant la chirurgie (J0) puis à 24h (J1) et 48h (J2) après la chirurgie.

(B) Le score moyen de gravité par groupe de souris est représenté en fonction du temps. Le score de gravité est déterminé toutes les 2 heures maximum pendant 2 jours, sauf la nuit (zones en pointillés).

(C) Courbe de survie de Kaplan-Meier.

b) Réponse inflammatoire initiale

Afin d'évaluer la réponse inflammatoire initiale caractéristique du sepsis, nous avons mesuré le taux de TNF- α plasmatique 48h après la chirurgie. Comme chez les patients en choc septique, on observe une augmentation du taux de TNF- α plasmatique chez les souris CLP par rapport aux souris contrôles, traduisant l'inflammation persistante induite par le sepsis (**Fig.35**).

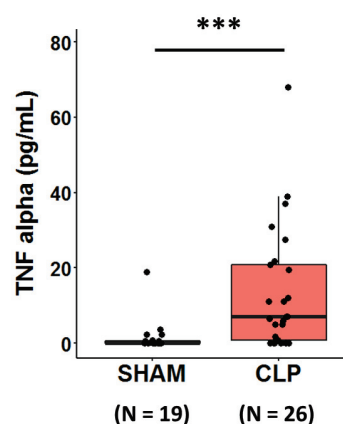


Figure 35. Augmentation du taux de TNF- α plasmatique induite par la CLP

48h après l'induction du sepsis, le plasma des souris CLP et SHAM est récupéré au moment de la mise à mort et congelé afin d'en mesurer ultérieurement le taux de TNF- α plasmatique par méthode ELISA sandwich (Mouse TNF- α ELISA MAX Deluxe ; Biolegend). Pour les souris CLP, un point supérieur à 200 pg/mL a été exclu afin d'obtenir une meilleure représentation graphique. Les données sont présentées sous forme individuelle et associées à des box-plots indiquant la médiane et l'interquartile (IQR).

***pValue < 0,001 (Mann-Whitney).

c) Altérations immunitaires induites pas le sepsis

Nous avons ensuite évalué les marqueurs immunitaires objectivant l'immunodépression induite par le sepsis chez les patients. Nous avons d'abord estimé la fonctionnalité des splénocytes de deux façons. Le premier test apprécie la capacité des splénocytes à synthétiser des cytokines inflammatoires (TNF- α) en réponse à un stimulus bactérien (LPS) (**Fig.36A**). Le deuxième test évalue la capacité de prolifération des splénocytes activés par un mitogène (PHA) ou un stimulus plus spécifique de la réponse T (billes recouvertes d'anticorps anti-CD3/CD28) (**Fig.36B**). Comme pour les PBMC de patients en choc septique, les splénocytes de souris CLP produisent moins de TNF- α en réponse à la stimulation LPS que ceux issus des souris contrôles. De même, ils ont une capacité de prolifération diminuée par rapport aux souris SHAM.

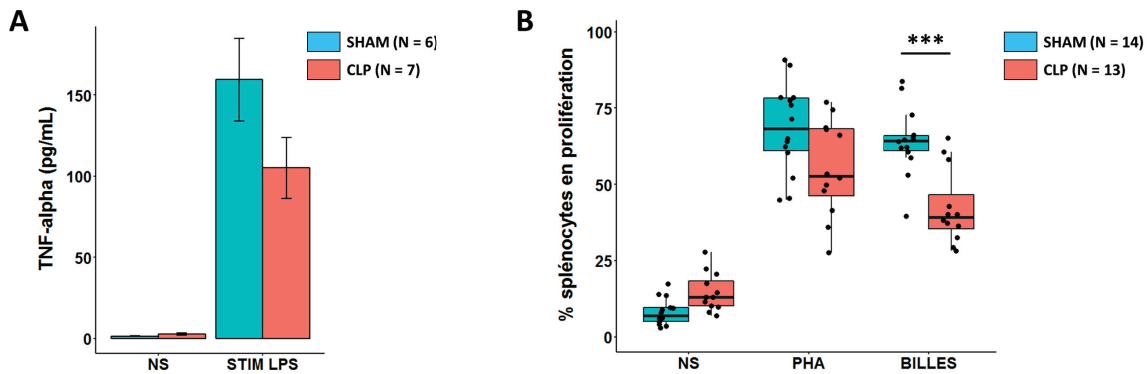


Figure 36. Altérations fonctionnelles des splénocytes induites par la CLP

(A) Sécrétion de TNF- α par les splénocytes après stimulation par LPS. Les splénocytes repris à la concentration de 10^6 cellules/mL dans du RPMI (+ pénicilline/streptomycine/fungizone/glutamine) supplémenté avec 10% de sérum AB humain et du β mercaptoethanol (RPMI+PSFG+10%SAB+ β mOH) ont été mis en culture 24h à 37°C. Pour chaque souris, les splénocytes ont été stimulés par 1 μ g/mL de LPS (« STIM LPS ») ou non (« NS »). Au bout de 24h, les surnageants de culture ont été congelés pour un dosage ultérieur de TNF- α par méthode ELISA. Les données sont présentées sous forme d'histogramme indiquant la moyenne et l'écart-type (sem).

(B) Prolifération des splénocytes après stimulation. Pour chaque condition, 200 000 splénocytes repris dans du RPMI+PSFG+10%SAB+ β mOH à la concentration de 10^6 cellules/mL ont été mis en culture 72h à 37°C. Pour chaque souris, une stimulation des splénocytes a été réalisée par PHA (4 μ g/mL) ou billes anti-CD3/CD28 (ratio billes/splénocytes de 4:3) (T Cell Activation/Expansion Kit mouse ; MACS Miltenyi). Avant la mise en culture, les splénocytes ont été marqués par du Tag-it Violet™ Prolifération and Cell Tracking Dye (Biolegend) afin de mettre en évidence la prolifération par cytométrie en flux. Seule la prolifération des splénocytes viables a été mesurée, grâce à l'utilisation d'iodure de propidium lors du passage des échantillons sur le cytomètre.

***pValue < 0,001 (Mann-Whitney).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux numérations de certaines populations cellulaires spléniques. Par rapport aux souris SHAM, les souris CLP présentent une leucopénie globale (**Fig.37A**) associé à une lymphopénie T CD4 ($p = 0,061$) (**Fig.37B**). En revanche, la perte cellulaire ne touche pas les Tregs, ce qui se traduit par une augmentation de la proportion des Tregs spléniques (**Fig.37C**). Ces résultats sont similaires à ceux décrits chez les patients septiques, et reflètent notamment le phénomène d'apoptose lymphocytaire touchant l'ensemble des organes lymphoïdes, mais à laquelle les Tregs sont résistants. Enfin, on observe une tendance chez les souris CLP à une lymphopénie B au niveau de la rate par rapport aux souris contrôles (médiane 22 versus 26 millions de cellules B respectivement ; $p = 0,214$ Mann-Whitney). La proportion de cellules B parmi les splénocytes totaux est légèrement augmentée chez les souris CLP (médiane 36 versus 39% chez les CLP et les SHAM respectivement ; $p = 0,636$ Mann-Whitney). Ces tendances sont en accord avec ce que l'on a décrit précédemment chez les patients septiques (*J Immunol* 2018).

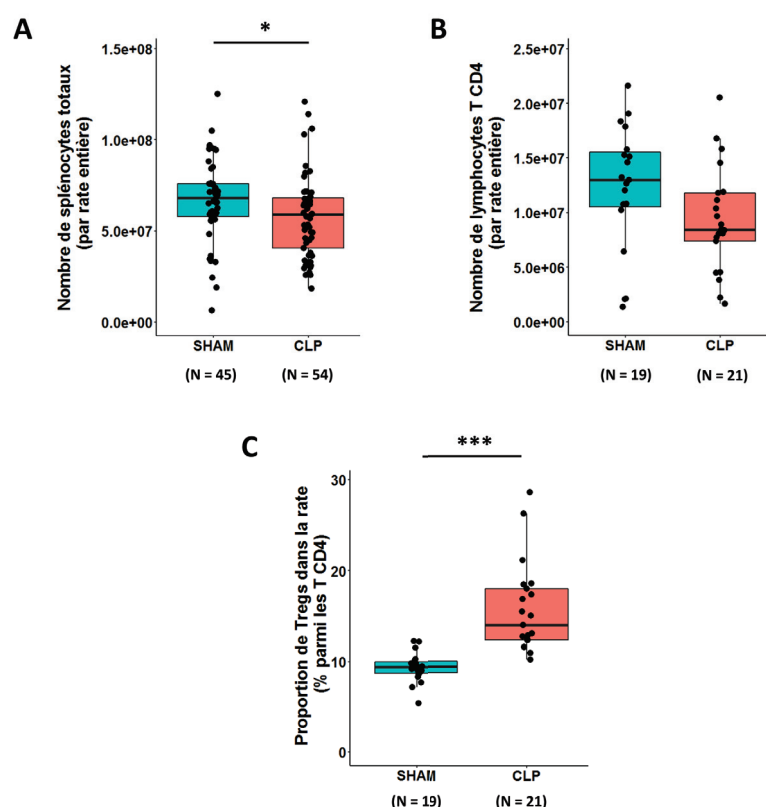


Figure 37. Lymphopénie et augmentation de la proportion des Tregs spléniques induites par la CLP

(A) La numération des splénoctytes totaux a été effectuée par cytométrie en flux à l'aide de billes Flow-Count™ (Beckman Coulter) et de LDS 751, marquant les cellules nucléées.

(B) Les valeurs absolues des T CD4 ont été déterminées en multipliant les proportions des T CD4 mesurées par cytométrie en flux par le nombre de splénoctytes totaux correspondant.

(C) Les lymphocytes Tregs sont définis comme des lymphocytes T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}.

*pValue < 0,05 ; ***pValue < 0,001 (Mann-Whitney).

En conclusion, nous avons réussi à mettre en place un modèle murin reproduisant au niveau splénique de nombreuses altérations immunitaires observées au niveau périphérique chez les patients en choc septique et caractéristiques de l'immunodépression induite par le sepsis (**Tableau 10**). Ce modèle a pour but de nous permettre de révéler de nouvelles altérations immunitaires induites par cette immunodépression post-septique et d'en explorer les mécanismes sous-jacents.

Tableau 10. Altérations immunitaires caractérisant l'immunodépression induite par le sepsis

CHEZ L'HOMME	MODELE MURIN
Phénomène d'endotoxine tolérance monocyttaire	
- Défaut de synthèse de cytokines proinflammatoires	✓
- Défaut de prolifération	✓
Lymphopénie	
- Globale	✓
- T CD4	✓
- B	✓
Augmentation de la proportion de lymphocytes T régulateurs	✓
Epuisement cellulaire T	
- Défaut de prolifération	✓

C. Mise en évidence et caractérisation de cellules B régulatrices au cours de l'immunodépression induite par le sepsis

Tous les résultats présentés ci-dessous portent sur des **cellules issues des rates de souris SHAM et CLP**. Pour davantage de clarté rédactionnelle, l'origine splénique des cellules immunitaires étudiées ne sera pas forcément reprécisée dans chaque paragraphe.

1) Les lymphocytes B ne sont pas régulateurs lors de l'immunodépression induite par le sepsis

Compte tenu de la synthèse accrue d'IL-10 par les lymphocytes B des patients en choc septique, notre hypothèse était que d'éventuels Bregs pouvaient apparaître lors du sepsis et potentiellement participer à l'immunodépression induite par le sepsis.

Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué la capacité des lymphocytes B des souris CLP à inhiber la prolifération des lymphocytes T de souris SHAM. Les lymphocytes B et T spléniques ont été purifiés par tri magnétique et mis en culture pendant 72h sous différentes conditions. Le taux de prolifération des lymphocytes T des SHAM ne diffère pas qu'ils soient isolés ou en coculture avec des lymphocytes B issus de SHAM ou de CLP (**Fig.38**). Ainsi, le sepsis ne semble pas induire de lymphocytes B avec des propriétés immunorégulatrices envers les lymphocytes T.

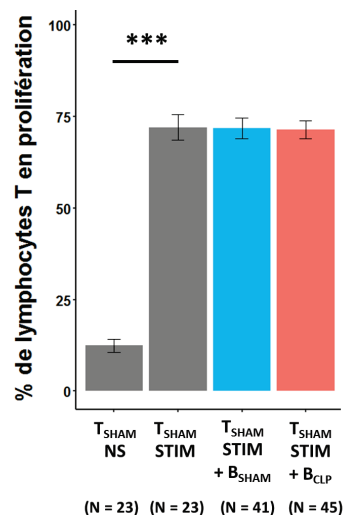


Figure 38. Absence d'inhibition de prolifération des lymphocytes T par les lymphocytes B de souris CLP

A partir de splénocytes totaux, les lymphocytes T ont été purifiés par sélection négative par tri magnétique (EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit ; StemCell) alors que les lymphocytes B ont été purifiés par tri magnétique (EasySep™ Mouse B Cell Isolation Kit ; StemCell) ou sur FACSARIA™ III (population B220^{hi}CD138⁻). Les lymphocytes B ont ensuite été marqués par CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit (ThermoFisher) et les lymphocytes T par Tag-it Violet™. Ces marqueurs fluorescents permettent après la culture de révéler la prolifération des lymphocytes T (perte de fluorescence lors de la division cellulaire) et de discriminer les B et T en coculture. Les lymphocytes ont été mis en culture pendant 72h à 37°C dans du RPMI+PSFG+10%SAB+βmOH à la concentration de 10⁶/mL. Les lymphocytes B ont été ajoutés à un ratio 1:1 dans les puits de coculture. Dans les

conditions « T_{SHAM} STIM », des billes anti-CD3/CD28 ont été ajoutées à un à un ratio billes/lymphocytes T de 4:3. Seule la prolifération des lymphocytes T viables est finalement mesurée, grâce à l'ajout d'iodure de propidium aux échantillons lors du passage sur le cytomètre de flux.

***pValue < 0,001 (Mann-Whitney).

Nous avons par ailleurs étudié certains marqueurs phénotypiques des lymphocytes B, qui auraient pu révéler d'éventuelles caractéristiques immunorégulatrices, mais sans succès. En effet, aucune augmentation de la proportion de lymphocytes B10 CD1d^{hi}CD5⁺ n'est observée dans la rate des souris CLP par rapport aux souris SHAM (**Fig.39A**). Pour rappel, ce phénotype définit les lymphocytes B synthétisant de l'IL-10 les mieux décrits dans la littérature. Par ailleurs, les lymphocytes B de souris CLP ne présentent pas d'altération de l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 (**Fig.39B**). Néanmoins, l'expression du HLA-DR est significativement diminuée à la surface des lymphocytes B de souris CLP, comme ce que nous avons décrits chez les patients en choc septique (*J Immunol* 2018) (**Fig.39B**). Enfin, l'expression des checkpoints immunitaires inhibiteurs PD1, PD-L1 et Tim-3 n'est pas modifiée sur les lymphocytes B des souris CLP (**Fig.39C**).

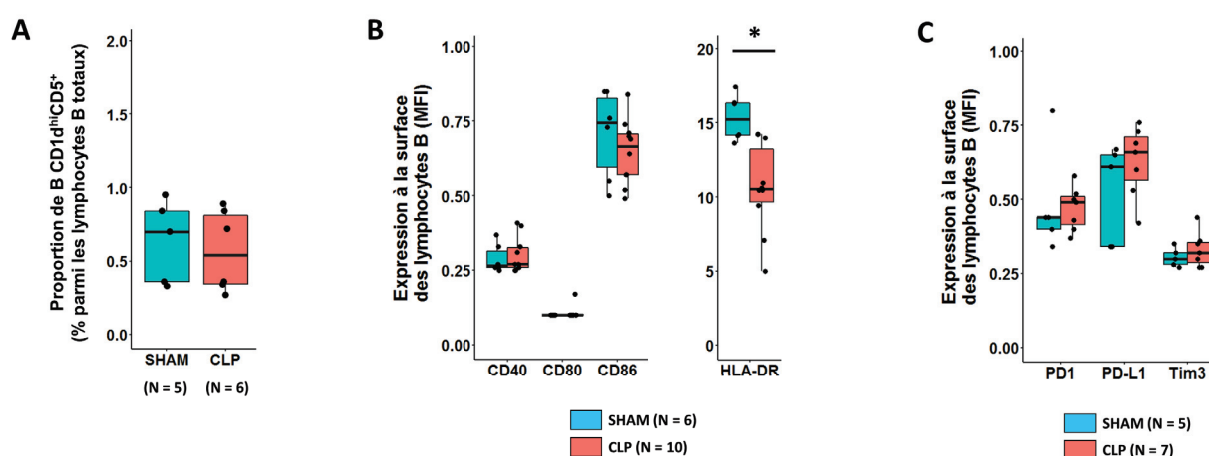


Figure 39. Peu de modifications phénotypiques des lymphocytes B après le sepsis

(A) Proportion de lymphocytes B10 dans la rate.

(B) Expression des molécules de costimulation et (C) des checkpoints immunitaires inhibiteurs à la surface de l'ensemble des cellules B220⁺CD138⁺. MFI : Moyenne d'intensité de fluorescence.

*pValue < 0,05 (Mann-Whitney).

2) Les plasmocytes induits par le sepsis présentent des propriétés immunorégulatrices

Les résultats décrits ci-dessus infirment la présence de Bregs lors de phase d'immunodépression induite par le sepsis. Cependant, des données récentes dans divers contextes cliniques suggèrent que, parmi la lignée B, les plasmablastes/plasmocytes présentent en réalité les fonctions immunorégulatrices les plus développées ^{210,275}. Compte tenu de la plasmocytose

importante observée dans le sang périphérique des patients, nous avons émis l'hypothèse du rôle immunorégulateur de ces plasmocytes.

Nous avons d'abord déterminé la proportion de plasmablastes/plasmocytes dans la rate des souris SHAM et CLP. Comme ce que nous avons montré dans le sang des patients en choc septique (*Jl 2018*), on observe une augmentation significative de la proportion de cellules B220^{lo}CD138⁺ parmi les splénocytes des souris CLP, le marqueur CD138 étant caractéristique de la lignée plasmocytaire (**Fig.40A**). Pour nous assurer que ces cellules correspondent bien à des plasmablastes/plasmocytes, nous avons triées les cellules B220^{lo}CD138⁺ en parallèle des cellules B220^{hi}CD138⁻ (**Fig.40B**). Cytologiquement, il existe un continuum de différenciation plasmocytaire au sein des cellules CD138⁺ triées. Au contraire, les cellules B220^{hi}CD138⁻ sont composées de cellules immatures (immunoblastes) et de petits lymphocytes B matures. Les cellules CD138⁺ correspondent donc morphologiquement à des plasmablastes/plasmocytes. Ainsi, comme dans le sang périphérique des patients en choc septique, une plasmocytose splénique importante se développe en réponse au sepsis chez les souris CLP.

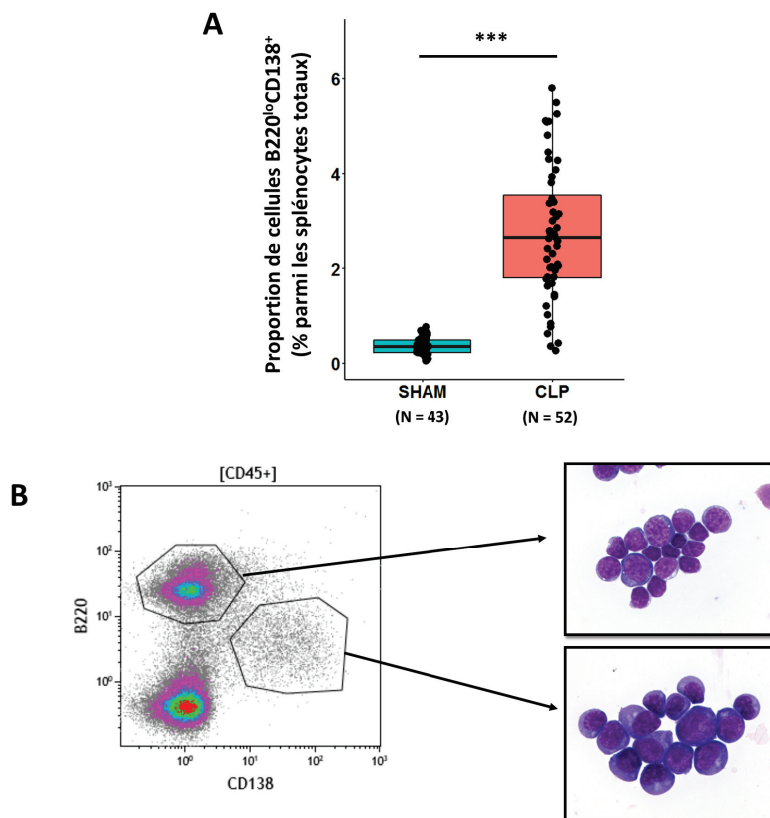


Figure 40. Plasmocytose splénique induite par la CLP

(A) Proportion de plasmocytes B220^{lo}CD138⁺ spléniques. ***pValue < 0,001 (Mann-Whitney). **(B)** Les populations B220^{hi}CD138⁻ et B220^{lo}CD138⁺ ont été triées sur FACSria™ III (Becton Dickinson). Les lames ont ensuite été préparées par cytocentrifugation et coloration au May-Grünwald-Giemsa puis analysées à l'aveugle par un cytologiste qualifié. Les images ont été prises avec un microscope Nikon Eclipse 80i au grossissement 60 avec une caméra Basler et un logiciel ICS Capture (Tribvn, France).

Pour vérifier notre hypothèse de l'apparition de plasmocytes potentiellement régulateurs au cours du sepsis, nous avons testé la capacité d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par les plasmocytes septiques de la même manière que pour les lymphocytes B (**Fig.41**). Aucune différence dans le taux de prolifération des lymphocytes T de souris SHAM n'est observée lors de la coculture avec des plasmocytes issus de souris contrôles. En revanche, une nette inhibition de prolifération apparaît lors de la coculture avec des plasmocytes issus de souris CLP. Ces résultats mettent en évidence la présence de plasmocytes régulateurs dans la rate des souris septiques.

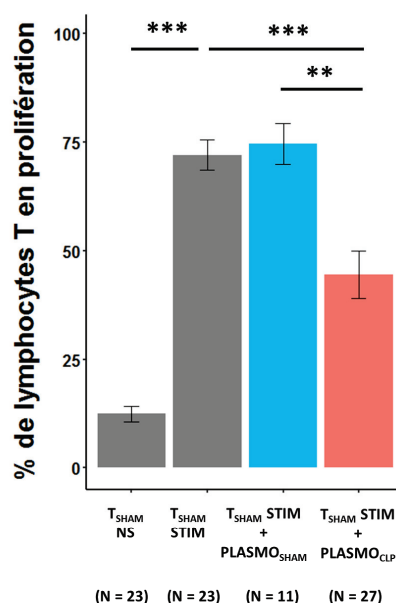


Figure 41. Inhibition de prolifération des lymphocytes T par les plasmocytes de souris CLP

A partir de splénocytes totaux, les lymphocytes T ont été purifiés par sélection négative en tri magnétique alors que les plasmocytes ont été purifiés par sélection positive en tri magnétique (EasySep™ Mouse CD138 Positive Selection Kit ; Stem Cell) ou sur FACSARIA™ III (population B220^{lo}CD138⁺). Les plasmocytes triés sur aimant ont ensuite été marqués par du CellTrace™ Far Red et les lymphocytes T par du Tag-it™ Violet. Les cellules ont été mis en culture 72h à 37°C dans du RPMI+PSFG+10%SAB+βmOH à la concentration de 10⁶/mL. Les plasmocytes ont été ajoutés à un ratio 1:1 dans les puits de coculture. Dans les conditions « T_{SHAM} STIM », des billes anti-CD3/CD28 ont été ajoutées à un ratio billes/lymphocytes T de 4:3. Seule la prolifération des lymphocytes T viables est finalement mesurée, grâce à l'ajout d'iodure de propidium aux échantillons lors du passage sur le cytomètre de flux.

pValue < 0,01 ; *pValue < 0,001 (Mann-Whitney).

3) Mécanismes des propriétés immunorégulatrices des plasmocytes septiques

Pour explorer les mécanismes de propriétés immunorégulatrices des plasmocytes septiques, nous avons d'abord conduit un test d'inhibition de prolifération des lymphocytes T comme décrit précédemment, en utilisant des inserts Transwell®. Ces inserts permettent une coculture de deux populations cellulaires séparées par une membrane poreuse, qui prévient les contacts cellulaires mais reste perméable aux facteurs solubles synthétisés (**Fig.42**). Ce dispositif permet de révéler de potentiels mécanismes dépendants du contact entre les populations cellulaires d'intérêt ou de la

sécrétion de facteurs solubles. Dans notre modèle, lorsque l'on empêche le contact entre les lymphocytes T spléniques issus de souris SHAM et les plasmocytes issus de souris CLP, on observe une levée significative de l'inhibition de prolifération T, mais seulement partielle (**Fig.42**). En effet, dans la condition Transwell®, le niveau de prolifération des lymphocytes T de SHAM ne revient pas au niveau initial des lymphocytes T seuls en culture. Ces résultats préliminaires laissent à penser que les plasmocytes régulateurs induits lors de la phase immunosuppressive du sepsis utiliseraient un mécanisme requérant un contact direct avec leurs cibles, mais pourraient également synthétiser des facteurs solubles immunorégulateurs.

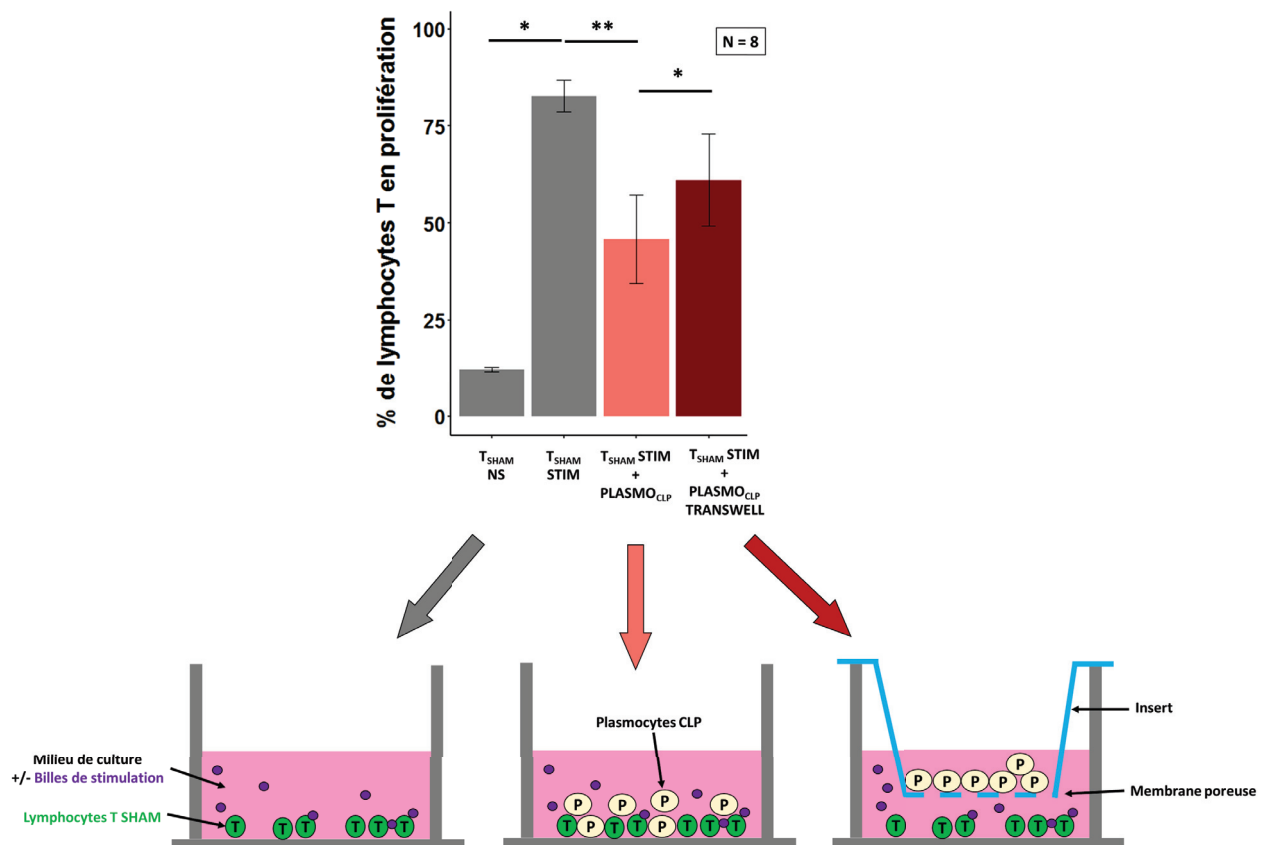


Figure 42. Levée partielle de l'inhibition de prolifération des lymphocytes T par les plasmocytes en absence de contact cellulaire

Test d'inhibition de prolifération des T par les plasmocytes de souris CLP en condition Transwell® (Corning). Les détails de la mise en culture sont les mêmes que décrites dans la figure 42. Dans la condition Transwell®, les lymphocytes T de souris SHAM sont déposés au fond du puits alors que les plasmocytes de souris CLP sont déposés au-dessus de la membrane poreuse. Les deux populations cellulaires sont à la concentration 10^6 /mL et le ratio lymphocytes T/plasmocytes est le même que dans les autres conditions de coculture, i.e. 1:1.

*pValue < 0,05 ; ** pValue < 0,01 (Wilcoxon).

Compte tenu de ces résultats, nous avons commencé à explorer quelques mécanismes régulateurs potentiels requérant un contact cellulaire. Les plasmocytes spléniques des souris CLP présentent une expression accrue des checkpoints immunitaires inhibiteurs PD1 et PD-L1 par rapport aux plasmocytes des souris SHAM (**Fig.43A**). L'expression des molécules de costimulation CD40, CD80

et CD86 à la surface des plasmocytes n'est pas modifiée après le sepsis, alors que de façon intéressante, l'expression de HLA-DR est augmentée (**Fig.43B**). Pour rappel, l'expression du HLA-DR est diminuée sur les monocytes et les lymphocytes B au cours de l'immunodépression induite par le sepsis, caractérisant un déficit de la fonction de présentation de l'antigène.

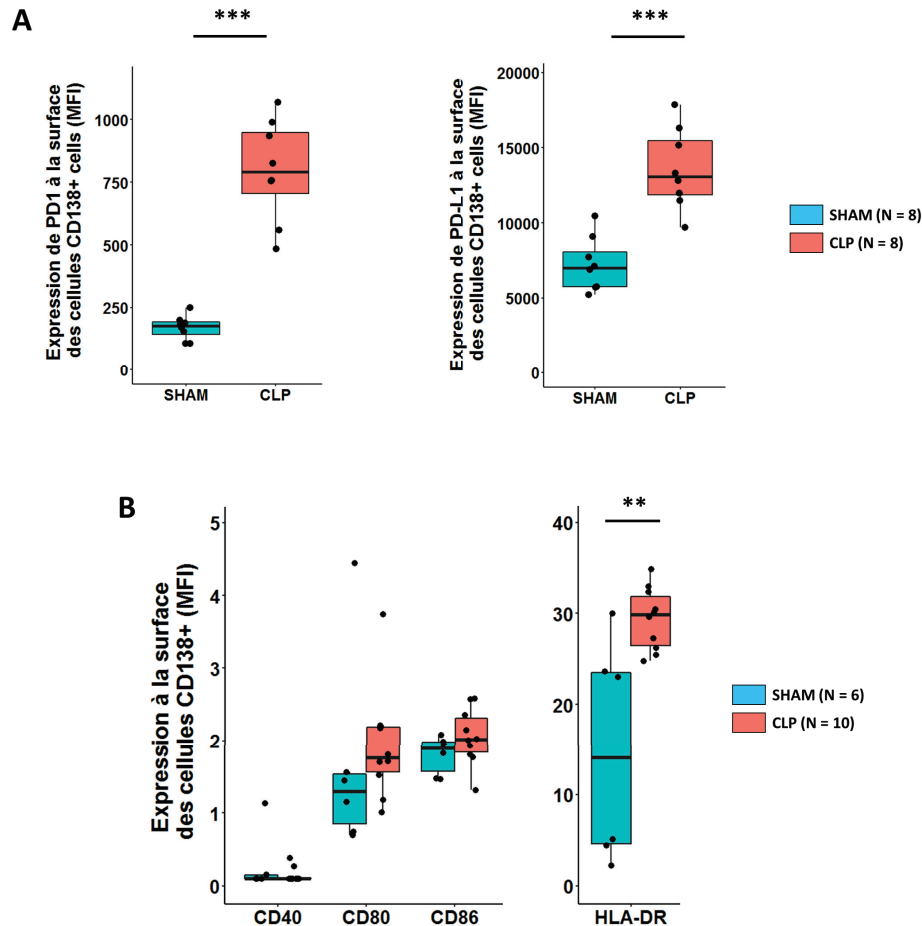


Figure 43. Potentiels mécanismes immunorégulateurs par contact cellulaire direct

(A) Mesure de l'expression de PD1 et PD-L1 et de (B) CD40, CD80, CD86 et HLA-DR à la surface de l'ensemble des plasmocytes B200^{lo}CD138⁺. MFI : Moyenne d'intensité de fluorescence.

pValue < 0,01 ; *pValue < 0,001 (Mann-Whitney).

En ce qui concerne la synthèse de facteurs solubles immunorégulateurs, Matsumoto *et al.* ont décrit que les plasmocytes synthétisant de l'IL-10 *in vivo* correspondaient aux plasmocytes CD138⁺CD44⁺. Nous avons donc recherché ce phénotype dans notre modèle. L'expression de CD44 est significativement augmentée sur les plasmocytes de souris CLP par rapport aux plasmocytes de souris SHAM (**Fig.44**). Etant donné que nous avons observé une synthèse d'IL-10 accrue par les cellules CD19⁺ (incluant les plasmocytes) stimulées chez l'homme (*J Immunol* 2018), cette observation révèle un possible mécanisme immunorégulateur des plasmocytes par la synthèse d'IL-10.

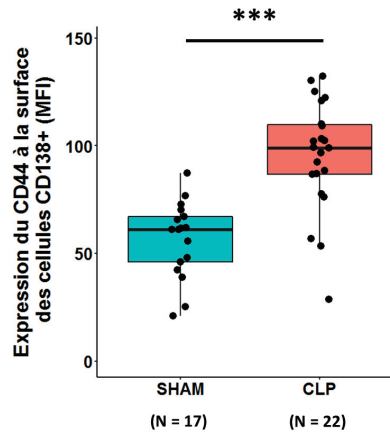


Figure 44. Potentiels mécanismes immunorégulateurs par la synthèse d'IL-10
 Mesure de l'expression de CD44 à la surface de l'ensemble des plasmocytes B200^{lo}CD138⁺. MFI : Moyenne d'intensité de fluorescence.
 ***pValue < 0,001 (Mann-Whitney).

Enfin, étant donné que les plasmocytes régulateurs observés par Lino *et al.* présentent un phénotype Lag-3⁺, nous avons étudié l'expression de ce checkpoint immunitaire inhibiteur à la surface des plasmocytes spléniques dans notre modèle murin. La proportion des plasmocytes Lag-3⁺ n'est pas augmentée chez les souris CLP par rapport aux souris SHAM (**Fig.45A**). Il n'existe pas non plus de surexpression globale de Lag-3 sur les plasmocytes de souris CLP (**Fig.45B**). Ainsi, les plasmocytes régulateurs observés lors du sepsis ne semblent pas appartenir aux plasmocytes dits « naturels ».

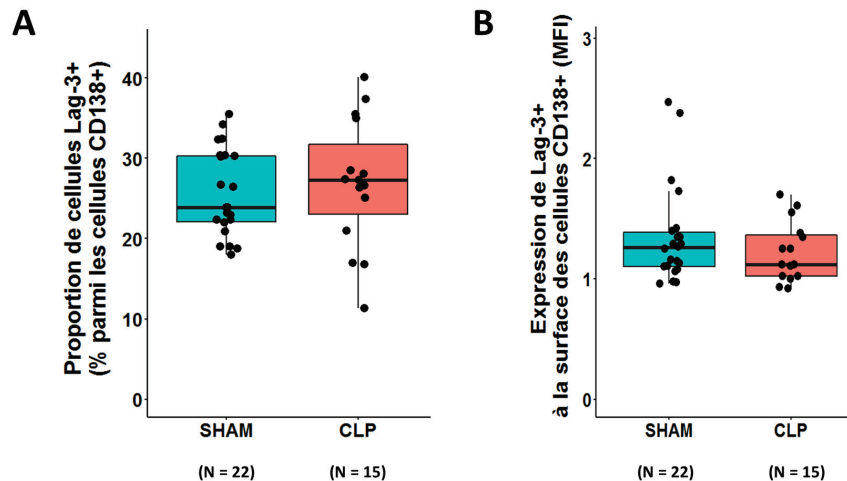


Figure 45. Absence de plasmocytes régulateurs « naturels » Lag-3⁺
(A) Proportion de plasmocytes B200^{lo}CD138⁺ exprimant Lag-3.
(B) Mesure de l'expression de CD44 à la surface de l'ensemble des plasmocytes B200^{lo}CD138⁺. MFI : Moyenne d'intensité de fluorescence.

4) Premières données chez les patients en choc septique

L'intérêt du modèle murin est de pouvoir mettre en évidence des anomalies qui auraient été difficilement observables avec le peu de matériel biologique disponible chez les patients en choc septique. Il nous a notamment permis de révéler la présence de plasmocytes régulateurs dans la rate des souris septiques et d'initier l'exploration des mécanismes sous-jacents à ces propriétés immunorégulatrices. La transposition de ces observations devra néanmoins être vérifiée chez les patients septiques. Nous avons initié cette démarche chez les patients en choc septique pour certaines caractéristiques des plasmocytes régulateurs découvertes dans le modèle murin.

La première étude que nous avons réalisée est l'évaluation de l'expression des checkpoints immunitaires inhibiteurs à la surface des plasmocytes circulants chez les patients. Nous avons conduit une étude observationnelle prospective incluant 17 patients à J3-5 après le choc septique, dont 10 patients inclus également à J6-8. En parallèle, nous avons inclus 15 volontaires sains appariés en âge et en sexe. Nous avons utilisé un panel multi-couleur de cytométrie en flux composé de marqueurs de lignées des lymphocytes B et des plasmocytes (CD19, CD38, CD138, CCR6) et de plusieurs checkpoints inhibiteurs (PD-L1, PD1, Tim-3). Le problème majeur de l'étude des plasmocytes circulants chez l'homme est que cette population représente moins de 0,5% des cellules du sang périphérique chez les volontaires sains. Ainsi, pour pouvoir observer une différence d'expression des checkpoints inhibiteurs, nous avons eu recours à une méthode d'analyse des données de cytométrie en flux utilisée pour les analyses multidimensionnelles de cytométrie de masse notamment. Sur un graphique représentant la granularité cellulaire (Side Scatter - SSC) et l'expression du CD19, nous avons effectué un fenêtrage englobant les cellules CD19^{hi}, CD19^{lo} et quelques cellules CD19⁻ afin de mieux discriminer les sous-types lymphocytaires lors de l'analyse de clustering suivante (**Fig.46A**). Puis, nous avons utilisé un algorithme Spade sur les cellules ainsi sélectionnées. Cet algorithme regroupe les cellules en clusters, selon leur similarité d'expression de l'ensemble des 7 marqueurs du panel (**Fig.46B**). L'avantage de cet outil est que même une très rare population peut être détectée et classée dans un cluster unique. Une fois l'arbre Spade construit, l'identification de chacun des 8 clusters (dénommés « nœuds ») se fait en observant leur expression moyenne des marqueurs de lignée (**Fig.46C**). Ainsi, les nœuds #4, #5 et #6 n'expriment pas le CD19 par rapport aux autres, contenant donc des cellules non-B. Les nœuds #1, #2, #3 et #8 ont en revanche une expression forte de CD19 et CCR6, et n'expriment pas ou faiblement le CD38 et CD138, marqueurs de différenciation plasmocytaire. Ceci caractérise des clusters de lymphocytes B. Enfin, les cellules du nœud #7 expriment plus faiblement CD19, perdent l'expression du CCR6 et surexpriment le CD38 et CD138. Le nœud #7 correspond aux plasmocytes. La dernière étape est de comparer l'expression des checkpoints inhibiteurs à la surface des différents clusters B entre les patients septiques et les volontaires sains (**Fig.46D**). Aucune population B ne surexprime Tim-3 ou PD-1 chez

les patients septiques par rapport aux volontaires sains. En revanche, les plasmocytes présentent une expression accrue de PD-L1 chez les patients à J6-8, ainsi que les lymphocytes B du nœud #8 ($p < 0,05$; Mann-Whitney). Ceci corrèle avec nos observations dans le modèle murin. Par ailleurs, les plasmocytes sont le seul cluster qui voit sa proportion augmentée par rapport aux volontaires sains (à la différence des lymphocytes B du nœud #8) ($p < 0,001$; Mann-Whitney). De façon intéressante, nous avons déjà observé cette plasmocytose sanguine à J3 chez les patients. Or, ici, nous révélons que la proportion de plasmocytes circulants augmente d'autant plus à J6-8 ($p < 0,001$; Mann-Whitney).

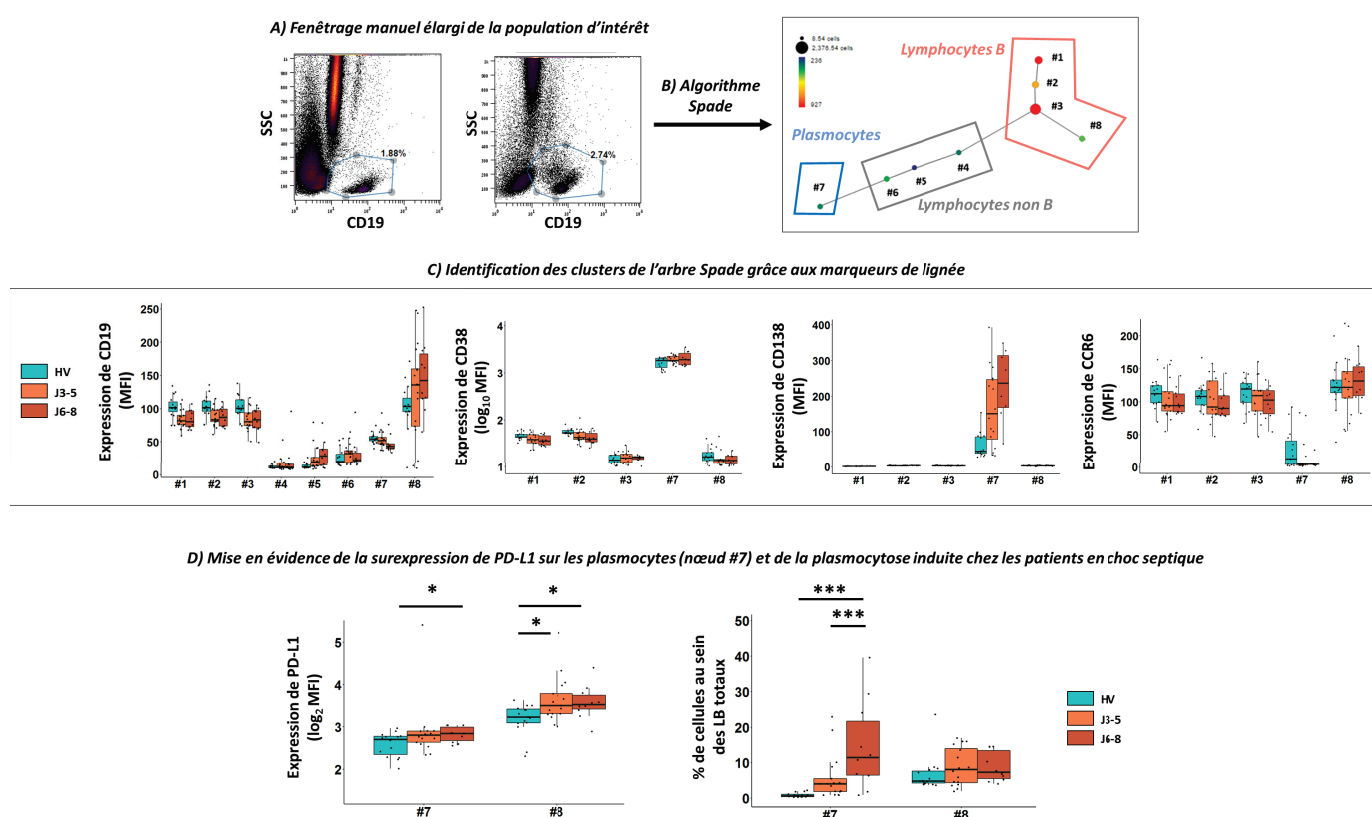


Figure 46. Surexpression de PD-L1 sur les plasmocytes des patients en choc septique

Une deuxième étude réalisée en parallèle du modèle murin a consisté à mesurer l'expression d'HLA-DR à la surface des plasmocytes chez les patients en choc septique à J3-5 après l'admission en réanimation. Des volontaires sains ont été recrutés en parallèle. On observe une tendance à l'augmentation d'expression du HLA-DR à la surface des plasmocytes chez les patients par rapport aux volontaires sains, comme montré dans le modèle murin (**Fig.47**).

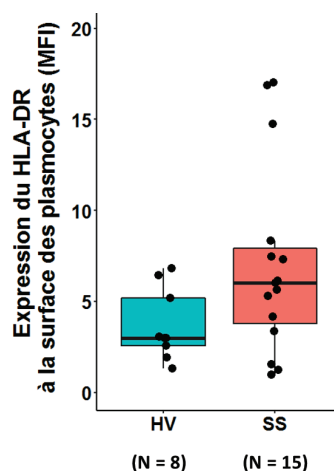


Figure 47. Surexpression du HLA-DR par les plasmocytes des patients en choc septique

Expression du HLA-DR à la surface des plasmocytes $CD38^{hi}CD138^{+}$ chez les volontaires sains et les patients à J3-5.

MFI : Moyenne d'intensité de fluorescence

($p = 0,108$; Mann-Whitney).

En conclusion, ce projet de recherche translationnelle a révélé l'existence de plasmocytes régulateurs lors de la phase d'immunodépression induite par le sepsis. Les mécanismes des propriétés immunorégulatrices de ces plasmocytes restent encore à explorer mais nos résultats préliminaires suggèrent des mécanismes par contact cellulaire ainsi que par facteurs solubles sécrétés. L'ensemble des données obtenues dans le modèle murin ainsi que chez les patients en choc septique sont récapitulés dans le **tableau 11**. Ces résultats sont encore préliminaires et ne feront donc pas l'objet d'une discussion à ce stade. Cependant, ils seront intégrés et discutés dans la discussion générale qui clôture ce manuscrit.

Tableau 11. Synthèse des premiers résultats montrant la présence de plasmocytes lors de la phase d'immunodépression induite par le sepsis dans le modèle murin et chez les patients en choc septique

CARACTERISTIQUE	<u>Dans le modèle murin,</u> Au niveau de la rate	<u>Chez les patients,</u> Dans le sang périphérique à J3-5
Plasmocytose réactionnelle	✓	✓
Propriétés immunorégulatrices des plasmocytes	Capacité d'inhibition de prolifération des lymphocytes T des plasmocytes	A démontrer
Surexpression de checkpoints immunitaires inhibiteurs par les plasmocytes	PD-1 et PD-L1	PD-L1
Présence de plasmocytes régulateurs naturels Lag3 ⁺	Non	A rechercher
Surexpression de HLA-DR	✓	✓
Synthèse d'IL-10	? Plasmocytes CD44 ⁺	Montrée seulement pour les cellules CD19 ⁺ totales, incluant les plasmocytes

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le sepsis est reconnu depuis 2017 par l'OMS comme une priorité de santé mondiale. En effet, son incidence croissante et sa forte mortalité en font un véritable enjeu de santé publique. Pourtant, cette pathologie est encore méconnue de la majorité de la population et aucun traitement spécifique n'est pour l'instant disponible sur le versant immuno-inflammatoire. Sa physiopathologie se caractérise par une réponse hyper-inflammatoire à une infection, engendrant des défaillances d'organes responsables de décès dès les premiers jours du sepsis. Des mécanismes régulateurs se mettent alors en place pour lutter contre cette inflammation excessive. Ces mécanismes initialement bénéfiques peuvent persister chez certains patients et entraîner une profonde immunodépression. Celle-ci est caractérisée par de nombreuses dysfonctions immunitaires engendrant la perte des cellules effectrices et le développement de populations immunorégulatrices. Ces altérations immunitaires représentent un probable frein à l'élimination de la source infectieuse primaire et favorisent l'apparition d'infections secondaires opportunistes et de réactivations virales, qui aggravent la mortalité. Ainsi, depuis quelques années, la stratégie thérapeutique envisagée chez certains patients est l'immunostimulation, consistant à cibler les altérations immunitaires pour restaurer une réponse anti-infectieuse appropriée. Plusieurs immunothérapies font actuellement l'objet d'essais cliniques, notamment le GM-CSF et l'IFN γ visant à stimuler les fonctions des cellules myéloïdes, les anticorps ciblant les checkpoints inhibiteurs PD1 et PD-L1 dans le but de lever l'épuisement cellulaire, et l'IL-7 améliorant la survie et la prolifération des lymphocytes T. Cette stratégie thérapeutique est d'autant plus prometteuse qu'elle est également en plein essor chez les patients atteints de cancers, présentant des anomalies immunitaires et un état d'immunodépression très similaires à ceux décrits chez les patients septiques. Néanmoins, les patients septiques constituent une population très hétérogène en termes de nature, d'intensité et de chronologie d'apparition des désordres immuno-inflammatoires. Dans ce contexte, la description exhaustive des altérations immunitaires et une meilleure compréhension de la physiopathologie du sepsis sont fondamentales pour espérer un succès thérapeutique. Elles pourraient mener à l'identification de biomarqueurs permettant l'individualisation des immunothérapies et éventuellement à celle de cibles thérapeutiques additionnelles.

Mon projet de thèse s'inscrit dans ce contexte. Les lymphocytes B représentent un acteur clé de la réponse anti-infectieuse et pourtant ont été peu étudiés dans la physiopathologie du sepsis. Compte tenu des données récentes de la littérature relatives à l'existence de cellules B régulatrices dans divers contextes cliniques, nous avons émis l'hypothèse que les cellules B pouvaient présenter des fonctions régulatrices et ainsi contribuer à l'établissement de l'immunodépression induite par le sepsis.

I. Plasmocytose réactionnelle et épuisement cellulaire des lymphocytes B chez les patients en choc septique.

Nous avons initié ce projet par une étude de patients en choc septique montrant que lors de l'immunodépression induite par le sepsis, les cellules B présentent des altérations phénotypiques et fonctionnelles similaires à ceux décrites pour les autres populations leucocytaires (**Article #1 J Immunol 2018**). En effet, les lymphocytes B subissent le même phénomène d'apoptose que les lymphocytes T et les NK, mais a priori y sont plus résistants, comme le démontre leur proportion accrue dans le sang périphérique des patients. Comme les monocytes, les lymphocytes B perdent leur expression d'HLA-DR membranaire, marqueur de la fonction de présentation antigénique. De plus, l'apparition de cellules B CD21^{lo/-}CD95^{hi} et la diminution des capacités de prolifération et d'activation illustrent un phénomène d'épuisement cellulaire touchant les lymphocytes B, comme observé pour les T et NK.

Par ailleurs, nous avons montré que les cellules CD19⁺ issus de patients en choc septique synthétisent de l'IL-10 après stimulation. La production d'IL-10 par les lymphocytes B au cours du sepsis n'a été montrée que dans deux cohortes de nouveau-nés^{306,307}. Dans ces études, la synthèse d'IL-10 était liée à la présence de cellules B CD24^{hi}CD38^{hi} circulantes, considérées comme les analogues des B10 murins chez l'homme. De façon intéressante, la présence de ces Bregs synthétisant de l'IL-10 était corrélée à un meilleur pronostic. Dans notre étude, nous n'avons pas identifié précisément la sous-population de cellules CD19⁺ responsable de la synthèse d'IL-10. Compte tenu des études sur les nouveau-nés septiques, il serait intéressant de vérifier la présence éventuelle de cellules CD24^{hi}CD38^{hi} chez les patients adultes en choc septique. De plus, nous n'avons pas pu étudier l'association entre la synthèse d'IL-10 et les paramètres cliniques (sévérité, mortalité, infections secondaires) puisque la mesure de la production d'IL-10 a été réalisée seulement sur 7 échantillons. Elle sera importante à évaluer car on peut supposer qu'en fonction du moment d'apparition des cellules B régulatrices, leur présence puisse être bénéfique si elle permet l'atténuation de la réponse inflammatoire, mais délétère si elle participe à l'immunodépression.

Enfin, cette étude nous a permis de mettre en évidence pour la première fois une plasmocytose importante dans le sang des patients en choc septique. Cette plasmocytose réactionnelle a été confirmée dans la seconde étude du travail de thèse, par cytométrie de masse (**Article #2 Sci Rep. 2018**). La différenciation plasmocytaire survenant chez les patients au détriment des cellules B naïves a été objectivée via l'outil d'analyse ViSNE par la perte des populations B CCR6⁺CD38⁻ et l'apparition d'un cluster de cellules B CCR6⁻CD38^{hi}. Remarquablement, ce phénomène a été observé malgré le faible effectif de la cohorte étudiée, corroborant son importance au cours du sepsis et illustrant la puissance du CyTOF à révéler des altérations immunitaires touchant des

populations rares de leucocytes. Il est reporté que la proportion de plasmablastes/plasmocytes chez les individus sains est inférieure à 0,1 % des leucocytes circulants ³¹³. Chez les patients septiques, la plasmocytose apparaît progressivement et atteint une proportion dix fois supérieure aux volontaires sains à J7.

Bien que peu fréquents, quelques cas de plasmocytose sanguine chez l'homme ont été décrits dans la littérature, dont le rôle paraît différer selon les contextes cliniques.

En effet, dans des cas de maladies auto-immunes, la plasmocytose dans le sang de patients lupiques et myasthéniques semble corrélée à l'activité de la pathologie ^{286,314}. De même, une plasmocytose a été décrite dans le sang de patients présentant des neuropathies auto-immunes chroniques, disparaissant après traitement par immunoglobulines IV ³¹⁵. Ces observations suggèrent que les plasmocytes circulants sont directement impliqués dans la physiopathologie de la maladie auto-immune, en synthétisant notamment des auto-anticorps pathogènes, *e.g.* anticorps dirigés contre le récepteur de l'acétylcholine et engendrant les troubles neurologiques de la myasthénie.

Au contraire, une étude sur des patients traités par Ig IV pour diverses maladies auto-immunes montre une apparition de plasmablastes IgG⁺ dans le sang de patients 7 jours après l'initiation du traitement. Parmi ces patients, ceux traités pour un syndrome de Guillain-Barré présentent un nombre de plasmablastes circulants inversement corrélé au délai d'amélioration des symptômes neurologiques, suggérant ici un rôle plutôt bénéfique de ces cellules ³¹⁶.

Par ailleurs, des plasmocytoses sanguines ont été observées chez des patients atteints de cancers. La majorité des cas concernent le myélome multiple ³¹⁷ et la leucémie à plasmocytes ³¹⁸, où les plasmocytes proviennent de la moelle osseuse et sont les cellules monoclonales touchées par la malignité. Néanmoins, dans d'autres cas de cancers, une plasmocytose circulante réactionnelle a été observée, et peut être associée à un mauvais pronostic et à un état d'immunodépression similaire à celui décrit dans le sepsis. En effet, dans le lymphome T angioimmunoblastique, l'état général des patients présentant une plasmocytose polyclonale est moins bon que celui des patients en étant dépourvus ^{319,320}. Chez des patients atteints de mélanome et de tumeurs solides, la présence de plasmocytes est associée à une dysfonction des lymphocytes B (*e.g.* diminution de la synthèse de cytokines après stimulation CD40/CpG et lymphopénie B) et à un épuisement cellulaire des lymphocytes T ³²¹.

Enfin, une plasmocytose sanguine polyclonale réactionnelle a été observée dans des contextes d'infections aiguës principalement virales (dengue ³²², hépatite A ³²³, Bunyavirus ³²⁴, Parvovirus B19 ³²⁵, virus syncytial respiratoire ³²⁶), mais également dans des cas de mucormycose ³²⁷, de syndrome de Kawasaki ³²⁸ et de sepsis bactériens à *Staphylococcus* ³⁰² et *Klebsiella pneumoniae* ³²⁹. Dans ces cas, la plasmocytose apparaît dans les premiers jours suivant le début de l'infection et est généralement suivie par une augmentation du taux d'immunoglobulines sériques. Une

plasmocytose médullaire n'est pas systématiquement associée. Une plasmocytose réactionnelle est également observée au bout d'une semaine en réponse à une immunisation post-vaccinale (tétanos, fièvre jaune, grippe). Elle est transitoire après vaccination, alors qu'elle peut persister jusqu'à éradication du virus lors d'une infection naturelle ³³⁰. Il a été montré que la plasmocytose réactionnelle post-vaccinale peut être prédictive du développement de la mémoire immunologique, du titre d'anticorps neutralisants et donc de l'efficacité vaccinale à long terme ³³⁰. Ainsi, l'apparition de plasmocytes/plasmablastes dans le sang périphérique lors de situations d'infections aiguës ou d'immunisation serait le reflet de la réponse immunitaire effectrice. Elle pourrait être médiée par la libération importante de cytokines pro-inflammatoires et notamment d'IL-6, observée dans plusieurs des cas cités ci-dessus (*e.g.* dengue, infection à Bunyavirus, kawasaki). En effet, l'IL-6 est connue pour induire la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et promouvoir leur survie ³³¹. Ceci est intéressant puisque l'IL-6 est l'une des cytokines majeures de l'hyper-inflammation observée dans la phase précoce du sepsis. Néanmoins, d'autres facteurs doivent être impliqués dans l'apparition des plasmocytes circulants, puisque des taux plasmatiques de cytokines élevés pro-inflammatoires n'étaient pas systématiquement observés dans les cas d'infections cités précédemment et que la plasmocytose réactionnelle n'est pas constatée dans toutes les situations cliniques associées à une production d'IL-6.

Ainsi, hors contexte d'hémopathies, les cas de plasmocytose sanguine sont rares, peu caractérisés et la fonction de ces plasmocytes circulants reste méconnue. Les quelques cas reportés de la littérature montrent un rôle ambivalent des plasmocytes circulants en fonction des contextes cliniques, paraissant plutôt bénéfiques dans les cas d'infection aiguës (sécrétion d'anticorps) et au contraire potentiellement délétères dans les cancers (immunorégulateurs ?). Le sepsis étant à l'interface entre un processus infectieux aigu et un état d'immunodépression similaire à celui décrit dans le cancer, la fonction des plasmocytes observés chez les patients mérite donc d'être précisée. Etant donné la synthèse d'IL-10 accrue par les cellules B chez les patients en choc septique (Article #1 de la thèse), nous avons fait l'hypothèse de l'implication de lymphocytes B / plasmocytes régulateurs dans le développement de l'immunodépression.

II. A la suite d'un choc septique, les plasmocytes présentent des propriétés immunorégulatrices

Dans le modèle murin, les lymphocytes B spléniques des souris septiques n'ont étonnement pas montré de propriétés immunorégulatrices. En revanche, une plasmocytose apparaît dans la rate des souris septiques et ces plasmocytes B220^{low}CD138⁺ sont capables *ex vivo* d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (**Article #3 en préparation**).

Certains de nos résultats préliminaires ne montrent pas de plasmocytose médullaire associée à la plasmocytose splénique chez les souris septiques, écartant une production médullaire *de novo* et suggérant un développement au niveau périphérique. Les plasmocytes septiques ne présentent pas de surexpression de Lag-3, éliminant l'hypothèse de plasmocytes « naturels » décrits par Lino *et al.*²⁷⁷. Le développement de ces plasmocytes serait ainsi plutôt d'origine réactionnelle.

Les quelques cas d'infections décrivant une plasmocytose réactionnelle dans la littérature semblent suggérer un rôle bénéfique de ces plasmocytes dans la réponse anti-infectieuse pendant les premiers jours suivant le début de l'infection, notamment par leur production importante d'anticorps. Néanmoins, certaines données suggèrent que la plasmocytose réactionnelle puisse parfois être associée à la sévérité de la maladie (*e.g.* dengue³²²), évoquant la présence potentielle de plasmocytes régulateurs également dans ces situations infectieuses. Il est ainsi probable que deux types de plasmocytes puissent composer cette plasmocytose réactionnelle en fonction de signaux tels que les pathogènes impliqués, la magnitude de la réaction inflammatoire engendrée et la persistance du pathogène : (i) des plasmocytes de type « effecteurs » synthétisant des anticorps bénéfiques dans la lutte anti-infectieuse et (ii) des plasmocytes de type « régulateur ». Il est notamment possible que ces deux types de plasmocytes coexistent dans certaines situations infectieuses et particulièrement après le sepsis. Considérant cette hypothèse et sachant que les patients septiques présentent un déficit en immunoglobulines circulantes, les plasmocytes pourraient alors être touchés au cours du sepsis par le même phénomène que l'ensemble des autres populations leucocytaires, à savoir la perte des cellules effectrices synthétisant les anticorps et l'apparition des cellules immunorégulatrices.

Certains de nos résultats préliminaires montrent que les fonctions régulatrices des plasmocytes paraissent dépendre du contact cellulaire avec les lymphocytes T. L'expression des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 à la surface des plasmocytes ne semble pas altérée après le sepsis. En revanche, contrairement aux lymphocytes B, les plasmocytes des souris et des patients septiques surexpriment HLA-DR. Il reste à déterminer si cette surexpression traduit seulement une activation cellulaire des plasmocytes, ou si elle joue un rôle à part entière dans les mécanismes immunorégulateurs, en facilitant le contact avec les cellules T ou en induisant les fonctions régulatrices des plasmocytes comme décrit chez les B10²⁵³. En lien avec ces résultats, nous nous sommes intéressés à l'expression des checkpoints immunitaires inhibiteurs. En effet, certaines données de la littérature rapportent une expression de checkpoints immunitaires inhibiteurs à la surface des plasmocytes régulateurs, notamment PD-L1 qui paraît jouer un rôle dans leurs propriétés immunorégulatrices²⁷⁶. Nous avons observé une augmentation de l'expression de PD1 et PD-L1 à la surface des plasmocytes des souris septiques, l'expression accrue de PD-L1 ayant été confirmée chez les patients en choc septique. Ces résultats sont particulièrement intéressants étant donné l'essor de

l'utilisation en clinique d'immunothérapies ciblant la voie PD1/PD-L1 en cancérologie et plus récemment dans le sepsis.

Par ailleurs, certaines de nos données préliminaires montrent que les plasmocytes pourraient également synthétiser des facteurs solubles immunorégulateurs. Corroborant cette hypothèse, nous avons observé une surexpression du CD44 par les plasmocytes de souris septiques, suggérant la probable présence de plasmocytes synthétisant de l'IL-10²⁷⁵. Cette observation est importante car la synthèse d'IL-10 est l'un des principaux mécanismes immunorégulateurs décrits pour les plasmocytes. De façon intéressante, certaines données suggèrent que la plasmocytose observée dans les réactivation virales à gammaherpes virus pourrait être directement induite par le virus résident dans les lymphocytes B, qui activerait par ailleurs la sécrétion d'IL-10 par ces cellules B dans le but d'inhiber les défenses antivirales de l'hôte²⁷⁹. Les réactivations virales étant un des marqueurs de l'immunodépression des patients septique, il sera pertinent d'évaluer l'association entre la plasmocytose et la survenue de réactivations virales chez les patients en choc septique. Ceci pourra être réalisé grâce à l'étude REALISM (REAnimation Low Immune Status Markers (REALISM) ; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02638779) qui intègre un large monitoring immunitaire (incluant la détermination des plasmocytes) et la mesure de la charge virale de plusieurs virus (Epstein-Barr virus, Herpesvirus humain 6, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus, Torque teno virus)³³². Par ailleurs, de nombreux autres médiateurs solubles ont été décrits comme mécanismes effecteurs des plasmocytes et des B régulateurs dans divers contextes cliniques (*e.g.* IL-35, granzyme, adénosine, TGF- β). Remarquablement, dans le myélome multiple, une forme soluble du récepteur BCMA (récepteur majeur de la physiologie plasmocytaire) est produite sous la dépendance d'une γ -sécrétase qui clive BCMA de la membrane des plasmocytes. BCMA soluble pourrait contribuer à l'immunodépression sous-jacente en complexant BAFF, prévenant ainsi la stimulation des cellules B normales et leur différenciation en cellules productrices d'anticorps polyclonaux. BCMA soluble pourrait également complexer APRIL et ainsi impacter la survie des plasmocytes effecteurs intramédullaires, fournissant un autre mécanisme d'immunodépression potentiel³³³⁻³³⁵.

L'exploration des propriétés immunorégulatrices des plasmocytes septiques devra être complétée dans le modèle animal. Ceci concerne d'une part l'évaluation de leur effet sur les autres populations leucocytaires (*e.g.* induction des MDSC/Tregs, anergie monocytaire). Des expériences *ex vivo* de coculture entre les monocytes et les plasmocytes septiques pourront par exemple identifier un éventuel effet des plasmocytes sur les défauts fonctionnels monocytaires. D'autre part, l'étude des mécanismes immunorégulateurs des plasmocytes devra être approfondie. La sécrétion des médiateurs solubles décrits ci-dessus pourra être évaluée en dosant leur concentration dans les surnageants de coculture, et l'expression de checkpoints inhibiteurs additionnels mesurée (*e.g.* CTLA-

4, BTLA). Enfin, l'implication de ces divers mécanismes dans les propriétés immunorégulatrices des plasmocytes devra être confirmée en étudiant l'impact de l'addition d'anticorps bloquants (*e.g.* anti-IL-10, anti-PD-L1) sur la fonctionnalité des cellules immunitaires dans les cocultures *ex vivo*.

Les premiers résultats intéressants observés dans le modèle murin ont été explorés chez l'homme (surexpression de PD-L1 et de HLA-DR) et sont concordants. Ceci laisse supposer que les plasmocytes régulateurs sont également présents en clinique et pourraient contribuer à l'immunodépression observée chez les patients. La suite du projet consistera donc à démontrer l'existence et le rôle des plasmocytes régulateurs chez les patients septiques.

III. Perspectives sur le versant clinique

Etude observationnelle du lien entre les plasmocytes régulateurs et les paramètres cliniques

Le lien entre la plasmocytose et l'immunodépression pourra être établi en montrant une association entre la présence de plasmocytes circulants et les paramètres cliniques. L'étude de cette association nécessite l'analyse de données issues de cohortes cliniques incluant un nombre important de patients pour espérer dégager des informations intéressantes et significatives. L'étude clinique observationnelle REALISM a inclus un nombre important de patients en choc septique et permettra ainsi d'obtenir ces informations ³³². Les premiers résultats de cette étude sont attendus au courant de l'année 2019.

Les points importants à explorer seront la cinétique de la plasmocytose au cours du temps et son association avec le développement d'infections secondaires et de réactivations virales. Ceci permettra de corroborer le lien entre plasmocytose et établissement de l'immunodépression. Par ailleurs, l'association entre la plasmocytose et la sévérité et la mortalité devra également être évaluée. En effet, certaines données de la littérature suggèrent que les marqueurs plasmocytaires pourraient représenter des facteurs pronostiques du sepsis. Une étude chez 112 patients septiques a montré que le taux de TACI plasmatique, mesuré à l'admission en réanimation est un facteur prédictif indépendant des défaillances d'organe développées dans les premières 48h ³³⁶. De la même façon que TACI est un régulateur majeur de la maturation et la survie des lymphocytes B, APRIL et BCMA sont fondamentaux dans le développement et la survie des plasmocytes. Ainsi, on peut supposer que les concentrations plasmatiques d'APRIL et de BCMA soluble puissent représenter de potentiels marqueurs d'intérêt, prédictifs de l'immunodépression induite par le sepsis. De façon intéressante, les taux sériques de BCMA soluble sont associés à la sévérité du myélome multiple chez l'homme et constituent de potentiels mécanismes immunorégulateurs des plasmocytes ^{333,334}. Ainsi, BCMA soluble et la γ -sécrétase responsable de sa production pourraient représenter de potentiels

biomarqueurs de l'activité régulatrice des plasmocytes, du pronostic du sepsis et pourraient guider l'introduction des thérapies immunomodulatrices³³⁵. Enfin, la plasmocytose sanguine n'apparaissant pas chez tous les patients en choc septique avec la même intensité, il serait intéressant d'étudier les associations entre cette plasmocytose et la nature de l'agent infectieux impliqué dans le sepsis.

De nombreuses données biologiques ont également été collectées au cours de l'étude REALISM, ce qui permettra par ailleurs d'étudier le lien entre la plasmocytose et altérations immunitaires décrites chez les patients en choc septique (*e.g.* lymphopénie, défaut de prolifération T, anergie monocytaire, proportion de neutrophiles immatures).

Caractérisation détaillée des plasmocytes régulateurs

Une caractérisation exhaustive des plasmocytes régulateurs est primordiale afin d'améliorer les connaissances physiopathologiques du sepsis, de mettre en évidence des signatures phénotypiques permettant leur identification et la révélation de potentiels mécanismes immunorégulateurs.

Dans ce but, l'emploi d'outils d'analyse multidimensionnelle semble pertinent. Dans ce travail de thèse nous avons évalué la faisabilité et la puissance de l'utilisation la **cytométrie de masse** dans une cohorte clinique de patients en choc septique. Remarquablement, malgré le peu d'échantillons biologiques disponibles, la perte cellulaire liée à l'étape de congélation et le faible effectif de la cohorte étudiée, le CyTOF a mis en évidence des altérations cellulaires couramment décrites dans la littérature (*e.g.* diminution du HLA-DR et augmentation de PD-L1 à la surface des monocytes), illustrant la validité des données générées. Il a par ailleurs révélé de nouveaux défauts immunitaires, telles qu'une signature post-septique homogène de plusieurs marqueurs phénotypiques monocytaires, des variations de proportions de certaines sous populations leucocytaires rares, et la différenciation plasmocytaire. Cet outil paraît donc particulièrement prometteur dans de plus grandes cohortes cliniques pour la caractérisation des altérations immunitaires induites par le sepsis. Notamment, l'essor de son utilisation depuis quelques années en recherche fondamentale et clinique ont permis d'en améliorer la standardisation, grâce à l'utilisation de billes de calibration, au développement de protocoles de marquage avant congélation et à l'amélioration du choix des marqueurs de lignée à intégrer aux panels. De par sa capacité à étudier simultanément l'expression sur des populations cellulaires rares de plusieurs dizaines de marqueurs, aussi bien intra qu'extracellulaires, le CyTOF représente un outil de choix pour le phénotypage détaillé des plasmocytes. Par ailleurs, nous avons débuté une analyse **Nanostring®** sur des plasmocytes spléniques purifiés de souris septiques et contrôles. Le Nanostring® est une méthode d'analyse multidimensionnelle qualitative mais également quantitative de l'ARN qui permettra de

caractériser de façon détaillé le transcriptome des plasmocytes régulateurs. En effet, le panel nCounter® PanCancer Immune Profiling que nous utilisons contient 770 gènes impliqués dans la réponse immune et adaptative (checkpoints immunitaires inhibiteurs, cytokines, facteurs de transcription...).

Les plasmocytes régulateurs comme cible thérapeutique ?

L'immunostimulation est en plein essor en cancérologie et solidement envisagée comme thérapeutique dans le sepsis. Elle consiste à stimuler les fonctions immunitaires effectrices (GM-CSF, IFN γ , IL-7) ou à cibler les mécanismes impliqués dans l'établissement de l'immunodépression, tels que les checkpoints immunitaires inhibiteurs. L'identification des plasmocytes comme nouvelle population cellulaire régulatrice pourrait représenter une opportunité de mettre en évidence une cible thérapeutique pertinente.

Déplétion des plasmocytes régulateurs

L'utilisation des plasmocytes régulateurs comme cible thérapeutique pourra être testée *in vivo* dans le modèle murin en étudiant l'effet de la déplétion des plasmocytes sur le développement des altérations immunitaires (*e.g.* restauration de la capacité de prolifération des lymphocytes T et de la sécrétion de cytokines inflammatoires par les monocytes, diminution de la proportion de Tregs). Certaines molécules ciblant les plasmocytes sont déjà utilisées dans d'autres contextes cliniques, comme le Bortezomib ou l'anticorps monoclonal anti-CD38 (Daratumumab) indiqués dans le traitement du myélome multiple, et pourront être testées *in vivo* dans le modèle préclinique.

Si notre hypothèse concernant l'implication des plasmocytes régulateurs dans l'établissement de l'immunodépression est juste, la déplétion *in vivo* des plasmocytes après induction du sepsis devrait atténuer les dysfonctions immunitaires. Cet aspect pourra également être évalué *ex vivo* sur des cellules de patients, en déplétant ou en bloquant les plasmocytes des cellules mononuclées du sang et en observant l'effet sur la fonctionnalité des lymphocytes T et des monocytes résiduels.

Identification de cibles spécifiques aux plasmocytes régulateurs

Le repositionnement des thérapeutiques anti-myélomateuses dans la prise en charge des patients septiques est une idée attrayante sur le plan expérimental mais n'est pas applicable à terme en clinique. En effet, étant donné la coexistence potentielle de plasmocytes effecteurs et régulateurs après un sepsis, il est probable que les thérapeutiques ciblant l'ensemble des plasmocytes ne donnent pas les résultats bénéfiques et pourrait même s'avérer néfaste en limitant l'action anti-infectieuse des plasmocytes effecteurs synthétisant les anticorps. Ainsi, il est probable qu'une meilleure stratégie sera d'utiliser des molécules ciblant les mécanismes d'action des plasmocytes

régulateurs ou visant spécifiquement les plasmocytes régulateurs. De plus, en considérant une hypothétique apparition séquentielle de plasmocytes effecteurs suivie de celle des plasmocytes régulateurs, le moment de l'administration des thérapeutiques pourrait également être crucial. Un autre avantage à cibler précisément les plasmocytes régulateurs est qu'ils sont inexistantes chez les volontaires sains et n'apparaissent qu'en réponse au sepsis, ce qui limiterait probablement d'éventuels effets indésirables.

Dans ce contexte, la mise en évidence de signatures protéiques ou transcriptomiques des plasmocytes régulateurs et de leurs mécanismes d'action est primordiale afin d'identifier des cibles thérapeutiques spécifiques. Les données générées par la cytométrie de masse et le Nanostring seront très utiles dans ce but. Ces signatures phénotypiques permettront également l'individualisation de ces traitements et leur monitoring (voir paragraphe III page 128).

A terme, si des cibles spécifiques sont identifiées, la dernière étape de ce projet sera d'évaluer l'effet de molécules bloquant précisément ces cibles dans le modèle murin afin de confirmer un intérêt clinique. Il est probable que cette étape requerra la production d'anticorps monoclonaux dédiés. La mise en place d'un modèle en « double-hit » semble l'outil le plus pertinent pour étudier l'effet des molécules bloquantes ³³⁷. Dans ce modèle, la thérapeutique à tester est administrée après l'induction du sepsis par CLP chez les souris. Après quelques jours, un nouveau challenge infectieux est réalisé (*e.g.* instillation intra-trachéale d'inoculum de *Pseudomonas aeruginosa*) et l'impact de la thérapie sur la réponse anti-infectieuse est étudié. En parallèle, l'effet des traitements pourront être testés *ex vivo* sur des cellules de patients.

CONCLUSION

CONCLUSION

Dans ce travail de recherche translationnelle alliant recherche clinique et modèle expérimental de choc septique, nous avons fait l'hypothèse que la lignée lymphocytaire B pouvait participer aux altérations immunitaires observées lors de la phase d'immunodépression induite par le sepsis.

Dans ce contexte, nous avons montré que les lymphocytes B présentent une perte de leur fonction de prolifération et un phénotype d'épuisement cellulaire (perte de l'expression de HLA-DR, surexpression de CD95). De surcroît, les lymphocytes B de patients septiques produisent de l'IL-10 (cytokine suppressive) et présentent des caractéristiques de cellules matures évoquant des plasmocytes. Une plasmocytose circulante est d'ailleurs retrouvée chez ces patients. Nous avons alors montré que ces plasmocytes possèdent des propriétés régulatrices (*i.e.*, inhibition de la prolifération des lymphocytes T) et des marqueurs phénotypiques (CD44, HLA-DR, PD-L1) suggérant la présence de plasmocytes régulateurs.

L'existence de plasmocytes régulateurs a été reportée dans quelques situations cliniques mais c'est la première fois, à notre connaissance, qu'elle est décrite dans le choc septique. Ce travail ouvre de nombreuses perspectives de recherche (*e.g.*, mécanismes régulateurs mis en jeu, liens avec les paramètres cliniques, association avec les réactivations virales...). Il constitue une pièce additionnelle dans la description exhaustive des altérations immunitaires induites par le choc septique. L'importance clinique des plasmocytes régulateurs au sein des mécanismes immunosuppresseurs post-septiques est maintenant à définir. Elle pourrait conduire à l'établissement de nouveaux biomarqueurs pour le suivi immunitaire des patients et à de nouvelles approches thérapeutiques.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1: Monneret G, **Gossez M**, Aghaeepour N, Gaudillière B, Venet F. **How clinical Flow rebooted sepsis immunology.** *En révision à Cytometry Part A*

ANNEXE 2: De Roquetaillade C, Monneret G, **Gossez M**, Venet F. **IL-7 and its beneficial role in sepsis-induced T lymphocyte dysfunctions.** *Crit Rev Immunol* 2018;38(6):433–451 (*in press*).

ANNEXE 3: Alingrin J, Coiffard B, Textoris J, Nicolino-Brunet C, **Gossez M**, Jarrot PA, Dignat-George F, Monneret G, Thomas PA, Leone M, Reynaud-Gaubert M, Papazian L. **Sepsis is associated with lack of monocyte HLA-DR expression recovery without modulating T-cell reconstitution after lung transplantation.** *Transpl Immunol.* 2018 Dec;51:6-11.

ANNEXE 4: Remy S, **Gossez M**, Belot A, Hayman J, Portefaix A, Venet F, Javouhey E, Monneret G. **Massive increase in monocyte HLA-DR expression can be used to discriminate between septic shock and hemophagocytic lymphohistiocytosis-induced shock.** *Crit Care.* 2018 Sep 11;22(1):213.

ANNEXE 5: Remy S, Kolev-Descamp K, **Gossez M**, Venet F, Demaret J, Javouhey E, Monneret G. **Occurrence of marked sepsis-induced immunosuppression in paediatric septic shock.** *Ann Intensive Care.* 2018 Mar 13;8(1):36.

ANNEXE 6: Letessier W, Demaret J, **Gossez M**, Allam C, Venet F, Rimmelé T, Monneret G. **Decreased intra-lymphocyte cytokines measurement in septic shock patients: A proof of concept study in whole blood.** *Cytokine.* 2018 Apr;104:78-84.

ANNEXE 7: Zouiouich M, **Gossez M**, Venet F, Rimmelé T, Monneret G. **Automated bedside flow cytometer for mHLA-DR expression measurement: a comparison study with reference protocol.** *Intensive Care Med Exp.* 2017 Aug 30;5(1):39.

ANNEXE 8: Monneret G, Demaret J, **Gossez M**, Reverdiau E, Malergue F, Rimmelé T, Venet F. **Novel approach in monocyte intracellular TNF measurement: Application to sepsis-induced immune alterations.** *Shock.* 2017 Mar;47(3):318-322.

ANNEXE 1



How Flow Cytometry rebooted sepsis immunology

Journal:	<i>Cytometry: Part A</i>
Manuscript ID	18-198.R1
Wiley - Manuscript type:	Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Monneret, Guillaume; Ho [^] pital E. Herriot – 5, Place d'Arsonval 69437, Lyon Cedex 03,, Flow Cytometry Unit, Immunology Laboratory, Gossez, Morgane; Ho [^] pital E. Herriot – 5, Place d'Arsonval 69437, Lyon Cedex 03,, Flow Cytometry Unit, Immunology Laboratory, Aghaeepour, Nima; Stanford, Department of Anesthesiology, Perioperative and Pain Medicine, Stanford University School of Medicine, Gaudilliere, Brice; Stanford University, Anesthesiology Venet, Fabienne; Ho [^] pital E. Herriot – 5, Place d'Arsonval 69437, Lyon Cedex 03,, Flow Cytometry Unit, Immunology Laboratory,
Key Words:	sepsis, HLA-DR, Flow cytometry, IL-7, Immunosuppression, Time of Flight mass spectrometry

SCHOLARONE™
Manuscripts

How clinical Flow Cytometry rebooted sepsis immunology

Guillaume Monneret^{1,2}, Morgane Gossez^{1,2}, Nima Aghaeepour³, Brice Gaudillière³, Fabienne Venet^{1,2}

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

2- EA 7426 « Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression » (Université Claude Bernard Lyon 1 -Hospices Civils de Lyon – bioMérieux), Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France.

3- Department of Anesthesiology, Perioperative and Pain Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94121, USA.

Corresponding author

Prof G. Monneret

Cellular Immunology Laboratory - Hôpital E. Herriot- Hospices Civils de Lyon

Pavillon E - 5 place d'Arsonval - 69437 LYON Cedex 03 - France

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

Funding

GM, MG and FV are supported by Hospices Civils de Lyon and Univeristy Lyon-1. BG is funded by National Institute of Health K23GM111657.

Key terms

Sepsis, HLA-DR, monocyte, IL-7, PD-1, flow cytometry, Time of Flight mass spectrometry

Abstract

On May 2017, the World Health Organization (WHO) recognized sepsis as a global health priority by adopting a resolution to improve the prevention, diagnosis and management of this deadly disease. While it has long been known that sepsis deeply perturbs immune homeostasis by inducing a tremendous systemic inflammatory response, pivotal observations based on clinical flow cytometry indicate that sepsis indeed initiates a more complex immune response that varies over time, with the concomitant occurrence of both pro- and anti-inflammatory mechanisms. As a resultant, some septic patients enter a stage of protracted immunosuppression. This paved the way for immunostimulation approaches in sepsis. Clinical flow cytometry permitted this evolution by drawing a new picture of pathophysiology and reshaping immune trajectories in patients. Additional information from cytometry by time of flight mass cytometry and other high-dimensional flow cytometry platform should rapidly enrich our understanding of this complex disease. This review reports on landmarks of clinical flow cytometry in sepsis and how this single-cell analysis technique permitted to breach the wall of decades of unfruitful anti-inflammatory-based clinical trials in sepsis.

1. Sepsis epidemiology and definition

On May 2017, the World Health Organization (WHO) recognized sepsis as a global health priority by adopting a resolution to improve the prevention, diagnosis and management of this deadly disease (1). Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection (2). Septic shock is the most severe form of sepsis in which hypotension persists despite adequate volume resuscitation thus requiring the use of vasopressors. According to recent definitions, in response to an infectious trigger, the unbalanced host (immune) response is at the center of sepsis pathophysiology (2).

Sepsis represents a major healthcare problem worldwide. As an example, in the USA sepsis is more frequent than myocardial infarction, breast or colon cancers (3-6). Recent modeling of available data determined the number of cases of sepsis in the entire world to over 20-25 million corresponding to > 6 million deaths per annum (7,8). Over years, 28-day mortality has remained high, ranging from 20 % for sepsis to over 40 % for septic shock despite improvement in patients' care (fluid resuscitation, source control, antimicrobial therapy). Whereas few therapeutic options evaluated in phase II clinical trials have demonstrated the potential efficacy of immunostimulation in sepsis, to date, no therapeutic intervention targeting host response has specifically been approved and sepsis remains the leading cause of mortality in intensive care units (ICU)(9,10). In addition, sepsis incidence has dramatically increased over the past decade and is expected to further augment. This rising incidence of documented cases of sepsis has been attributed not only to demographic changes, with a large population of patients with co-morbidities (cancer, diabetes, chronic inflammatory diseases) but also to the expansion of treatments with drugs or invasive medical devices that weaken the immune response. Improved coding of sepsis and its increased awareness has additionally been mentioned as a possible cause (4). More worrisome, the United Nations projects that the global human population over the age of 60 will increase by more than threefold in next decades and will exceed the size of the global population of young individuals by 2050. Thus, the burden of sepsis is expected to increase continuously in the forthcoming years as sepsis is a disease of the elderly (incidence increases

exponentially with age). Importantly, according to the Centers for Disease Control and Prevention, over \$ 22 billion is spent annually on hospitalizations for sepsis in the USA representing the most expensive hospitalization cause in this country (11). Moreover, during hospitalization, septic survivors are at high risk of developing nosocomial infections (due to induced immunosuppression – see below) that are associated not only with an increased morbidity, mortality and hospital length of stay but also with an important augmentation in patient's hospitalization costs. Even after hospital / ICU discharge, infections remain the leading cause for patients' readmission and death (12-14). Thus, in all respects, the cumulative burden of sepsis on public health is dramatically high and sepsis is likely to become "the quintessential medical disorder of the 21th century" (15).

2. Novel understanding of sepsis immunology

As early as 1975, MacLean, Meakins and colleagues (16-18) reported on the delayed hypersensitivity skin testing in response to recall antigens after injury. This lack of response was associated with enhanced mortality and risk of nosocomial infections which are evocative of immunosuppression. In 1991, the group of Cavaillon observed alterations in inflammatory cytokine response of septic patients' blood upon ex vivo LPS challenge suggesting modifications of innate immunity (19). Meanwhile, the group of Richard Hotchkiss made several contributions to the field by reporting on the massive lymphocyte apoptosis in septic mice and patients supporting impairments of adaptive immunity. Simultaneously, the inability of various anti-inflammatory approaches aimed at blocking exuberant inflammation to show any clinical benefit (20) has led clinicians and researchers to reconsider their understanding of immune response in sepsis pathophysiology. From early 2000, it was progressively hypothesized that the host response to sepsis associates a pro-inflammatory phase and an anti-inflammatory compensatory response which could become immunosuppressive (21,22). The main mechanisms sustaining this process have been then progressively discovered and are still regularly reinvestigated at the light of recent technological and scientific advances (*e.g.*, bioenergetic, epigenetic, transcriptomic). They have been extensively described in various reviews

and they will not be reported here (23-25). In addition, the decades of inconclusive clinical trials with promising host targeted therapies are a reminder that septic patients comprise a heterogeneous group of individuals who are unlikely to respond uniformly to a treatment protocol (26). An important driver of this heterogeneity is patient's individual immune status, which varies with age, sex, comorbidities (including infectious exposure through life), disease progression and underlying pathophysiology. This illustrates the importance of immune monitoring in sepsis to better describe patients' immune status, improve the understanding of pathophysiology and identify novel therapeutic targets and associated biomarkers. In the present review, we will present seminal studies that used flow cytometry to describe sepsis induced immune alterations. We will focus on clinical studies that, by nature, take patients' heterogeneity into account. These studies leveraged flow cytometry as a primary immuno-assay to precisely define immune trajectories in patients suffering from sepsis. Results from these flow cytometry-based clinical studies reshaped our understanding of sepsis immunology by demonstrating the occurrence of immunosuppression in patients. This is particularly important since features of immune failure in septic patients have striking similarities with those seen in cancer for which tailored targeted immunotherapies currently provide spectacular positive results (27,28). This constituted the rationale for translating immunostimulation strategies from cancer to sepsis in recent Randomized Controlled Trial (RCT) using IL-7 or anti-PD-1 antibodies (27). Other candidates that have proven to be efficient as adjunctive anti-cancer agents by acting on immunosuppressive mechanisms could thus be repurposed in sepsis.

3. Landmarks of flow cytometry in sepsis

Decreased monocyte HLA-DR (mHLA-DR) expression

Following several reports describing decreased expression of mHLA-DR after injury, the seminal work by Volk's group in Berlin described the beneficial immunostimulant effect of IFN- γ in a small cohort of septic patients. This highlighted the major interest of this marker in identifying septic patients with altered immune response (29). Indeed, in this small clinical trial, patients' stratification was based on

low mHLA-DR expression and positive response to treatment was easily monitored by longitudinal mHLA-DR measurement. Loss of mHLA-DR clinically illustrates the phenomenon of endotoxin tolerance characterized by a reduced responsiveness to a secondary infectious challenge (i.e., refractory state to subsequent endotoxin challenge *ex vivo*) following a first inflammatory stress. Low mHLA-DR expression also reflects a decreased antigen presentation capacity since HLA-DR molecules belong to histocompatibility complex class II (MHC II) system (23). For now, a consensus exists for considering low monocyte HLA-DR (mHLA-DR) as a surrogate marker of sepsis-induced immunosuppression (30,31). mHLA-DR has been the most studied and validated biomarker in the field (> 200 publications). In clinics, the magnitude and the persistence overtime of mHLA-DR decrease is demonstrated to be associated with increased mortality and nosocomial infections. It is noteworthy that, after adjustment for usual clinical confounders in multivariate analyses, decreased mHLA-DR remains an independent predictor of mortality / occurrence of nosocomial infections after sepsis (32,33). Thus, immunosuppression illustrated by altered monocyte response contributes to increased risk of adverse events in sepsis and immune recovery is likely a key parameter contributing to patients' favorable outcome. Since these initial studies, there has been a constant increase of citations matching "HLA-DR & sepsis" (figure 1) illustrating the rising interest and use of this biomarker in clinic. mHLA-DR is now used to stratify patients in RCT evaluating immunostimulation in sepsis (e.g., GRID study, NCT02361528) and to monitor drug efficacy (34,35).

It is also important to mention that, at admission, an extremely increased inaugural mHLA-DR value recently helped to unequivocally exclude a diagnosis of septic shock in a patient presenting with organ dysfunctions due to hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) characterized by tremendous inflammatory responses(36). This preliminary report needs further assessment in various types of HLH. Upon confirmation, as septic shock and HLH would require opposing treatments (i.e., no steroids vs high dose of steroids), mHLA-DR may be of crucial help for clinicians regarding patients' care and management. Thus flow cytometry may be useful clinical tool for the management of sepsis emergency medicine. In addition, it reopens the door for potential use of various immunomodulatory

agents that have been initially found ineffective due to lack of stratification whereas they retrospectively demonstrated significant protective effect in the most inflammatory patients (37-39). The more and more popular use of mHLA-DR is based on a standardized flow cytometry protocol that guaranties results reproducibility between laboratories thus permitting multicentric evaluation of this marker and comparable patients' stratification between sites. In 2005, a group of experts (40) proposed a consensual protocol based on the use of calibrated beads (with known amounts of fluorochrome) to convert means of fluorescence intensities to numbers of antibodies bound per cell (AB/C). As this protocol requires only 2 monoclonal antibodies (anti-HLA-DR and anti-CD14 Abs), it is accessible to most inclusion centers with Flow facilities. Inter-laboratory assessment between centers equipped with cytometers from different manufacturers provided excellent results (41). However strict pre-analytical conditions are mandatory (staining within 1.5 h after blood collection or within 4 h if storage at + 4°C) and limit a wider use of mHLA-DR. To circumvent this drawback, a fully automated table top cytometer with simple operating procedures (injection of patient's sample into a cartridge) was developed for use at the bedside or in emergency labs. Beta site evaluation for mHLA-DR evaluation showed convincing preliminary results (42).

Noteworthy, beyond sepsis, mHLA-DR is progressively becoming a popular immunomonitoring tool in other ICU contexts (traumas, burns), and other clinical conditions (gastroenterology, cancer, hematology, transplantation). Indeed, as monocytes are plastic cells fitted with capacity to both detect danger (and trigger inflammation) and resolve inflammation once danger is eliminated, the rapidly changing HLA-DR level on their surface likely reflects, at a given time point, the resultant of all immune forces applied on monocytes. Consequently, mHLA-DR regulation is not specific of any disease but rather appears as a relevant global inflammatory indicator of milieu intérieur. As such, it constitutes a useful biomarker in many clinical situations.

Immature neutrophils and myeloid-derived suppressor cells

For long, the markedly increased number of circulating immature neutrophils termed “band cells” is an established immunologic feature found in peripheral blood of septic patients. More recently, two independent groups reported on increased proportion of immature neutrophil with low CD10/CD16 expression and immunosuppressive properties in peripheral blood from septic patients. Increased percentage of these immature neutrophils was associated with increased mortality after sepsis (43,44). These recent results on immature/immunosuppressive neutrophils aggregate with the expanding description of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in infectious contexts (45). MDSC constitute a heterogeneous population of immature myeloid cells including progenitors / precursors of monocytes, neutrophils and dendritic cells (46,47). They are mainly characterized by their suppressive properties (both on innate and adaptive immunity) and are released upon various inflammatory / infectious signals. Recently, Uhel et al., described an association between increased MDSC number in blood and forthcoming occurrence of nosocomial infections after sepsis (48). Unfortunately, to date, Human MDSC definition lacks consensual phenotypic characterization (usable in whole blood for routine basis) and published results were obtained according to various phenotypes, either in whole blood or in Ficoll enriched fraction (49). Thus, further clinical investigations will require better standardization. Upon development of appropriate staining protocol, it is likely that analysis of MDSC populations will provide crucial information in clinical studies.

Lymphocyte alterations

In contrast to the initial innate inflammatory phase, until recently the adaptive immune response has received less attention in the description of sepsis-induced immune alterations. This is striking considering that more than 40 years ago, Meakins et al. described in septic patients the altered delayed-type hypersensitivity (16) which is mostly a reflection of lymphocyte dysfunction. Characterization of lymphocyte response in sepsis has nevertheless improved over the last 10 years.

Absolute lymphocyte count

By using hematological analyzers or flow cytometry, studies have described the major fall in absolute lymphocyte count (ALC) in septic patients. Seminal studies showed that apoptosis was playing a central role in that process and identified an association between the persistence of lymphopenia and increased mortality (50,51). It has been shown that sepsis represents the first cause of lymphopenia among patients in university hospital (52) and that severe lymphopenia is already present on patients' admission and affects every lymphocyte subpopulations (53). However, the extend of this lymphopenia is variable depending on cell subpopulations, with some subpopulations such as regulatory T cells (Tregs) being less affected (see below). Because ALC is part of the complete blood cell count on hematology analyzers and is thus available 24/7 in every hospital, the association of this cellular alteration and poor outcomes in septic patients is now easily evaluated in large prospective clinical studies and can be retrospectively assessed in various sepsis cohorts (54-57). Overall, results homogenously show that decreased ALC is associated with initial severity upon ICU admission while persistent lymphopenia is associated with increased mortality and occurrence of nosocomial infections after sepsis. Consequently, lymphopenia depth has recently been selected as a stratification marker in the first clinical trial evaluating IL-7 in septic shock patients. Only patients with ALC < 900 cell/ μ l were included in the study (58).

Increased regulatory lymphocytes

While the presence of a subpopulation of CD4⁺ T cells with regulatory properties had been known for long in mice, the exact phenotype usable to identify these cells by flow cytometry in human was only described in 2001 (59,60). Based on this phenotype (i.e., CD4⁺CD25^{high}) and the subsequent identification of Foxp3 as a specific intracellular marker for these cells (61,62), it was repeatedly observed that the percentage of Tregs is increased in septic shock patients with a maximum at day 3 after shock (63). It was proposed that this relative increase in percentage was due to Treg relative resistance to apoptotic mechanisms induced after sepsis (64). Later on, the role of these cells in sepsis-induced innate and adaptive alterations was showed (65,66). Thanks to improvement in flow cytometry phenotyping such as the addition of CD127 staining and standardization of intracellular

Foxp3 staining for its use in clinic (67), large prospective multicenter clinical studies have evaluated this parameter in ICU patients (68). It was showed that increased percentage of Treg in critically ill patients is associated with increased risk of subsequent nosocomial infections and that this parameter could be part of an immunopanel to stratify patients suitable for immuno-intervention in a precision medicine approach (68).

Few data are available regarding B cell response in septic patients. The decrease in circulating absolute B cell number has been shown (53) while their relative percentage among total lymphocytes was increased in patients as observed for Tregs (69). Interestingly, remaining circulating B cells present with an altered phenotype and altered functions (69). While the presence of B cells with regulatory functions has been shown in mice models of infections and in some rare clinical contexts, preliminary data suggest that these cells might be induced after septic shock (70). This deserves to be further explored in sepsis.

Co-inhibitory molecule expressions

Increased co-inhibitory molecule expressions and role of co-inhibitory pathways in T cells exhaustion have been evaluated multiple times in cancer and chronic viral infections (71). In sepsis, a seminal work reported on the increased expressions of PD1 and PDL1 on circulating immune cells on a limited number of septic shock patients and on the role of these molecules in sepsis pathophysiology in mice model of sepsis (72). The associations between increased PD1 and PDL1 expressions and decreased T cell proliferation, increased risk of death and nosocomial infections were subsequently described in a larger cohort of septic shock and trauma patients (73). This observation was confirmed by other groups and was completed by the description of the increased expressions of other co-inhibitory molecules such as BTLA, Tim3, LAG3 (25). Based on these observations and on ex vivo studies showing the efficacy of anti-PD1 and anti-PD-L1 blocking antibodies in improving sepsis-induced T cell alterations (74-76), the first clinical trials evaluating immune checkpoint inhibitors that are currently revolutionizing cancer treatment have been completed in septic patients (NCT02960854, NCT02576457). Results from these clinical trials are strongly awaited.

Functional testing

Importantly, altered immune cell phenotypes are associated with functional alterations, such as altered cytokine production (23,30). Nevertheless, the potential added value of functional testing in clinical monitoring remains to be demonstrated. This is in particular because, as opposed to immunophenotyping, those tests lack of automatization and standardization: e.g., long incubation time, lengthy cell purification procedures, cell permeabilization, and complex protocols with numerous staining / wash cycles (77,78).

One specific aspect in which functional tests may appear informative is the control of treatments' efficacy (see below). Indeed, functional testing may appear as a gold standard in this context because it directly measures *ex vivo* the capacity of a cell population to respond to an immune challenge. Such test may indicate whether a given therapy was truly effective in restoring immune functions in patients. Among immune functional assays that have been evaluated in clinic, measurement of intracellular cytokine content by flow cytometry appears as one of the most promising technique. Indeed, novel whole blood flow cytometry protocols provided significant information in septic patients regarding TNF- α production in monocytes (79) or TNF- α , IL-2, IFN- γ production by CD4+ and CD8+ lymphocyte (80). However, technical optimization remains to be done to specifically fit with sepsis monitoring (e.g., nature and concentration of stimulants, incubation time).

Is this immunosuppression?

Immunosuppression lacks specific clinical manifestation. As such, the definition of immunosuppression is based on the combination of immunological alteration (i.e., the quantitative or functional alteration of a given immune cell population) and the documented increased occurrence of infections. This definition describes all patients after sepsis (24,25). Indeed, on the one hand, we described above important immune alterations in patients. On the other hand, increasing numbers of clinical evidences highlight septic patients' diminished capacity to fight secondary

infections by weakly virulent germs (including fungi) or reactivation of dormant viruses (TTV, CMV, HSV). In this context, altered immune functions are reported as independent predictors of forthcoming infections in multivariate analyses including classic risk confounders (i.e., prior exposition to antibiotics, exposure to invasive devices such as central venous lines or intubation, comorbidities). In addition, the leading cause of readmission and long-term mortality within first years after surviving sepsis is infection (12-14). In line, an increased risk for cancer has also been recently reported after septic shock (81) that may constitute another clinical event related to chronic immunosuppression.

Taken together, according to definition, these data indicate that septic patients present with immunosuppression that is more or less pronounced and durable depending on individual. Some patients may retain persistent immune defects on a long term basis which may participate in their increased susceptibility to subsequent infections and aggravate occurrence of deleterious outcomes. Thus, immunostimulation has appeared as a sound therapeutic option (24,25,82). However, appropriate therapeutic strategy relies on our capacity to identify, in a complex situation mixing both pro- and anti-inflammatory responses rapidly varying over time, the most immunosuppressed patients (figure 2). Moreover, it has been shown that variations in the human immune response are largely driven by non-heritable influences (83). Among various components, co-morbidities (including infectious exposure through life) and age are of major importance. As septic patients are older (median around 65 years) and present with various comorbidities, this reinforces the idea that an individual monitoring of immune parameters is of crucial importance as, depending on their own personal history, no patient will immunologically respond like another. International experts agree that, among other reasons, the heterogeneity of septic patients may have participated in the previous failure of clinical trials evaluating host targeted therapies in sepsis (84,85). The use of biomarker for patients' stratification appears thus as a mandatory step in the design of next clinical trials evaluating immunoadjuvant treatments in sepsis (24,30,31). So far, as previously seen in this review, absolute lymphocyte count (including CD4+ and regulatory lymphocytes) and decreased

expression of mHLA-DR appear as the most robust markers usable in multicenter studies (figure 3). Both measurements are standardized and their variations are associated with altered functions and deleterious outcomes (either nosocomial infection occurrence or mortality). In addition, monitoring of MDSC and / or immature neutrophils (as markers of bone marrow activity and of chronic low grade inflammation), lymphocyte PD-1 and monocyte PD-L1 expressions (as potential stratification markers for anti-PD-1 / anti-PD-L1 treatments – see below) are good candidates upon further validation in larger cohorts of patients.

4. Current multicenter studies and clinical trials

Early Flow on patients' admission

Most flow cytometric studies of sepsis have focused on delayed immune consequences (i.e., after the first 48 hours). However recent studies have examined the role of flow cytometry in the early management of septic patients. Regarding sepsis diagnosis, increased neutrophil CD64 expression has been shown to be a highly sensitive (>95%) and specific marker for systemic infection and sepsis in adults, neonates and children (86). Low HLA-DR expression associated with PCT determination (i.e., usual biochemical marker of sepsis) tended to reinforce sepsis diagnosis (87) as well as increased CD8/CD19 ratio in another study (88). In contrast, very high values of mHLA-DR may be indicative of HLH (see above and (36)). These studies pave the way for the use of flow cytometry in the diagnosis of sepsis. However, flow cytometry approaches will need to be assessed in comparison with reference markers (i.e., PCT and CRP) since the measurements of these proteins are inexpensive, fully automated (24/7 available) and readily available.

Multicenter studies and improved standardization

Identifying the most severe patients is another opportunity for the clinical application of Flow in sepsis. In a pilot study, percentage of immature granulocytes (CD10^{low}/CD16^{low}) was demonstrated to predict early clinical deterioration at the acute phase of sepsis (44). Those preliminary results were recently confirmed in a multicentric multicolor flow cytometric study (SEPTIFLUX-2) including 781

patients in 11 centers (56). An increased circulating immature neutrophil percentage at the acute phase of sepsis was linked to clinical worsening, especially when combined with T-cell lymphopenia. The authors concluded that early flow cytometry could help clinicians to target patients at high risk of clinical deterioration. Beyond these interesting results, this study was the first to highlight the feasibility of performing large multicentric multicolor flow cytometry studies in ICU patients. Both Beckman Coulter and BD Biosciences flow cytometers were harmonized as previously established for lymphoma classification (89). In line, the ExPRES-Sepsis study recently reinforced this report. In this study evaluating standardized multi-site flow cytometry in about 400 acutely ill patients with suspected infections from 4 different centers, 47 leukocyte biomarkers were simultaneously assessed (90). Markers of immune suppression (increased neutrophil CD24 and PD-1 and decreased mHLA-DR expressions) showed the strongest associations with clinical outcomes. Moreover, a multicenter, prospective observational cohort study of critically ill patients in four UK ICUs has been published (INFECT study)(68). Three cell surface markers associated with immune cell dysfunctions (CD88 expression on neutrophil, mHLA-DR, percentage of regulatory T cells) were assayed. This study reported that these markers could predict subsequent risk of secondary infections. This study (90) along with SEPTIFLUX-2 (56) and ExPRES-Sepsis (68), all published in 2018, demonstrated that harmonizing Flow protocols is now an achievable objective. Before starting studies, ensuring intercenter reproducibility in setting up thresholds and gates should be performed (e.g., listmodes blindly analyzed). Then, standardization would imply the use of stabilized blood samples as controls (when possible), common standard operating procedures based on antibodies from same batch from a single manufacturer, commercially available standards for results comparison across labs (calibrated beads, e.g., setup and tacking beads) as well as internal (provided by manufacturers) and external controls (e.g., UK NEQAS). In addition, the development of lyophilized pre-formulated antibody panels also represents a major improvement for FCM standardization in RCTs. As an example, FOXP3-lyophilized tubes are currently used for regulatory T cells determination (67) in an RCT evaluating low-dose IL-2 treatment for type 1 diabetes (DIABIL-2 study, NCT02411253).

Furthermore, new technical developments (low cost compact portable flow cytometer, bedside flow cytometry or chip-based flow cytometry) are now being proposed that will facilitate the use of Flow at the bedside in ICU (see above in mHLA-DR paragraph (42)). For now, such techniques remain devoted to very simple applications but we may expect major developments in the forthcoming years, including multicolor flow cytometry.

As septic patients form a heterogeneous population, biomarkers characterizing patients' immune trajectories are useful to identify subgroups of patients that may benefit the most from an immune modulatory intervention. These biomarkers should be viewed as markers for patients' enrichment more than tailored stratification *stricto sensu*. So far, patients' stratification was mostly based on Flow which remains the most appropriate tool to individualize immunotherapy (Table 1). Recent phase II trials in the field used either mHLA-DR or lymphocyte count to stratify patients (34,91). In addition, one may expect further developments in PD-1 stratification as anti-PD-1 and anti-PD-L1 are believed to be good candidates in sepsis (92).

Another important application of Flow-based biomarkers is to monitor drug efficacy. The restoration of mHLA-DR expression has been successfully used to control IFN- γ or GM-CSF treatment effects (29,34). Recently, in critically ill patients, a sharp peak of mHLA-DR expression was observed in patients receiving GM-CSF (35). In HLH patient, mHLA-DR was successfully used to increase dosage of corticosteroids to control inflammation process (36). In the recent IRIS study, efficacy of IL-7 was measured by decreased expression of CD127 (i.e., IL-7 receptor) and by a peak of increased Ki67 as surrogate marker of lymphocyte proliferation (58). Of note, in controlling drug efficacy, functional testing might be an appropriate tool as it really reflects cell restoration in response to an immune challenge (i.e, more appropriate than cell counting or phenotyping).

5. The promise of Cytometry by Time of Flight mass spectrometry

The advent of high content immune profiling technologies provides new opportunities for the in-depth characterization of septic patients' immune states. Cytometry by Time of Flight mass spectrometry (CyTOF), or mass cytometry, is a particularly promising single-cell technology, as it allows for the comprehensive monitoring of the distribution and activities of all immune cell subsets present in a blood sample (93,94). Rather than fluorescent reporters used in traditional flow cytometry, mass cytometry utilizes antibodies conjugated to stable isotopes of rare earth metals. By exploiting the resolution, dynamic range and near absence of background noise offered by mass spectrometry, mass cytometry allows for the simultaneous detection of over 50 parameters on a cell-by-cell basis (95,96). The high parametrization afforded by mass cytometry allows for the precise phenotyping and distribution of virtually every immune cell subset, as well as a number of functional attributes which are assessed simultaneously at the single-cell level. Functional attributes routinely measured with a mass cytometry assay include cell proliferation, apoptosis, intracellular signaling responses, and intracellular cytokine production (97). In addition, recent developments in mass cytometry reagents allow the single-cell assessment of epigenetic modifications (98) and mRNA expression (99,100).

The general concept of utilizing mass cytometry to characterize immune states associated with disease progression or response to therapy has been demonstrated in multiple clinical contexts (101), including malignancies (102-104), rheumatological diseases (105), aging (106), traumatic injury (107-109), and pregnancy (110,111). While the use of mass cytometry in sepsis is still in its infancy (112), observational studies in the context of traumatic injury provide the groundwork for the deep immune profiling of complex inflammatory states such as sepsis. Not unlike sepsis, traumatic injury produces a conserved inflammatory response that engages both the innate and adaptive branches of the immune system (113). However, recent mass cytometry analyses of patients undergoing major surgery showed that underlying the canonical immune response to traumatic injury were distinct immune phenotypes associated with surgical recovery outcomes (108,109). In sepsis, the use of mass cytometry in a preliminary study led to the description of novel immune alterations (70). For

instance, it was observed that increased checkpoints inhibitor expressions were not uniformly co-expressed on T lymphocyte population (e.g, TIM-3 and PD-1, Figure 3) but that each immune checkpoint was overexpressed on different T lymphocyte subsets. Putative consequences of such disparate expression remain to be investigated. Another novel result was the identification in septic patients of a very mature subset of B lymphocytes (Figure 3) absent from controls. These cells might be circulating regulatory B cells never reported before in septic patients (70). Thus, the field of sepsis research is primed for similar translational studies that bring mass cytometry “to the bedside”. Exciting applications of this technology will include creating a high-resolution cellular atlas of the human immune response to sepsis, identifying immune signatures predictive of clinical outcomes, and tailoring promising immune therapies such as anti-PD-L1 and IL-7 to individualized immune phenotypes.

The mass cytometry analysis of clinical samples has certain limitations. The technology requires complete ionization of immune cells to their elemental composition, which precludes further cell-based assay once the sample is analyzed. Although the number of antibodies measured per single cell is unparalleled, developing a new mass cytometry assay requires a priori selection of markers of interest. Combining mass cytometry with traditional fluorescence-based cell sorting (114) and untargeted RNA sequencing will become increasingly useful for informing the design of future mass cytometry antibody panels. Most importantly, the increasing dimensionality of mass cytometry datasets – often comprised of thousands of immune features – comes at a price, referred to as the “curse of dimensionality” (115). Extraction of features using traditional analysis by human experts is time consuming a potential source of error (116,117) but a broad range of algorithms have been developed for objective extraction of immunophenotypes from mass cytometry data (118,119). The structure of mass cytometry data is also highly intercorrelated, reflecting the interconnected nature of the human immune system. Novel analytical methods – such as the recently developed cell-signaling Elastic Net algorithm (110) – that account for the dimensionality and correlated nature of

large mass cytometry datasets are needed to ensure the statistical validity and generalizability of identified immune predictors of clinical outcomes.

These high dimensional analysis methods will allow not only the integration of multiple classes of single-cell mass cytometry measurements but also the integration of mass cytometry data with other high-throughput biological assays (such as metabolomics, transcriptomics, and proteomics assays) (120). Such multi-omic modeling of inflammation in humans may reveal novel biological connections between functional readouts from discrete cell types and circulating molecular factors, which hold promise for the development of integrative bioassays with high predictive performance (121,122).

Taken together, mass cytometry has now reached the level of technological and computational maturity needed for deep clinical profiling of sepsis to lay the foundation for the design of precision-interventions based on the status of a patient's immune system.

6. Conclusion

As described in this review, sepsis is entering the era of precision medicine. Clinical Flow has played a critical role in this evolution by drawing a new picture of pathophysiology and by cracking the wall of decades of unfruitful anti-inflammatory-based clinical trials. Considering the current revolution in cancer treatment and the parallels that can be drawn between the host immune responses to cancer and sepsis, immunotherapeutic interventions hold great promise for the targeted treatment of septic patients. That said, sepsis being a complex syndrome with deleterious consequences on all organs, it is plainly obvious that immunostimulation would not save all septic patients. It will preferentially work in the most immunosuppressed patients and this reasoning is all the more applicable since we can use flow cytometry to stage each patient's immune status and depict immune trajectories. Hopefully, we may soon obtain complementary information from mass cytometry and other high-dimensional flow cytometry platform. So far, mHLA-DR, immature neutrophils and/or MDSC count, lymphocyte count along with PD-1 molecules expression – all measured by flow cytometry – offer relevant information for identifying individual trajectories. Recent IL-7 RCT results and recent

observational multicenter studies indicate the feasibility of the approach of flow-based RCT. Taken together, Flow cytometry reshaped sepsis immunology and paved a new way of success for tackling this hitherto deadly disease.

Table

Table 1. Biomarker-guided clinical cases and trials with immunostimulatory drugs in sepsis.

*: mHLA-DR was assessed in broncho-alveolar lavages, **: inclusion criteria is organ failure (including sepsis).

Interventions	Targeted cells (for stratification)	Biomarkers (at inclusion)	Number of patients	Randomization	Bibliographic Reference or NCT
IFN- γ	Monocytes	HLA-DR	35	No	(29)
IFN- γ	Monocytes	HLA-DR	9	No	(123)
IFN- γ	Monocytes	HLA-DR*	21	yes	(124)
IFN- γ	Monocytes	HLA-DR	1	No	(125)
IFN- γ	Monocytes	HLA-DR	2	No	(126)
IFN- γ	Monocytes	HLA-DR	1	No	(127)
IFN- γ	Monocytes	HLA-DR	Not published yet	yes	NCT03332225
GM-CSF	Monocytes	HLA-DR	38	Yes	(34)
GM-CSF	Monocytes	HLA-DR	Not published yet	Yes	NCT02361528
GM-CSF	Monocytes	HLA-DR	1	No	(128)
GM-CSF	Monocytes	HLA-DR	1	No	(129)
GM-CSF	Monocytes	Whole blood TNF release	14	Yes	(130)
GM-CSF	Monocytes	Whole blood TNF release	Not published yet	Yes	NCT03769844**
GM-CSF	Neutrophils	Phagocytic capacity	38	Yes	(35)
Anti-PD-1	Lymphocytes	PD-1 expression	1	No	(125)
IL-7	Lymphocytes	Absolute count	27	Yes	(58)

Legend to figures

Figure 1. “HLA-DR and sepsis” citations over years. Yearly number of citations of articles matching terms HLA-DR and sepsis from 1997 to present time (publication year of landmark paper of Docke et al. is marked by a red arrow). Data from Web of Science.

Figure 2. Immune trajectories in sepsis. Theoretical evolutions over time of immune status of different septic patients are presented. Net inflammatory/suppressive immune responses are very heterogeneous in kinetics, duration and depth. Patients with dashed line return spontaneously to immune homeostasis overtime. Patients with continuous lines present with dysregulated immune responses. These patients should be identified to benefit from host directed immunointerventions.

Figure 3. Illustrative example of unsupervised analysis of CyTOF results in healthy volunteers and septic patients. These results have been obtained from reference (70) **(A)** SPADE clustering analysis was performed in order to group peripheral blood mononuclear cell sub-populations into “nodes” according to phenotype similarities. These nodes and their relationships are represented in a minimum spanning tree format (i.e. SPADE tree). Size of the nodes illustrates the number of cells within the clusters. In this analysis, CD4 expressing cells are highlighted as red nodes while CD19 expressing cells are represented as green nodes. **(B)** ViSNE visualization tool was then performed on selected CD4+ cells from SPADE nodes. Based on the t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) algorithm, ViSNE determines the two dimensional representation of single-cell data sets that best matches their respective local and global geometry. Cells get unique x- and y-coordinates (tSNE1 and tSNE2) according to their expression of parameters from CyTOF panel. Their relative positions on the two-dimensional plot indicate similarities in terms of expression pattern. In the current analysis, we used color as a third dimension to visualize specific marker expression levels (PD-1 and Tim-3) in one representative example of a septic patient. Red and blue color intensities respectively represent high and low expression levels of the indicated marker. In this illustrative septic shock patient, PD-1

and Tim-3 are clearly not co-expressed by same CD4 T cell subpopulations (red squares). **(C)** Alternatively, ViSNE algorithm was performed on selected CD19+ B cells to compare sepsis vs healthy volunteers. Expression level of CD38, a marker of B cell maturation was visualized on the ViSNE plots in one representative septic shock patient and one healthy donor. A depletion of cells from the center of the map (green arrows), but an enrichment within the upper right cell cluster (purple arrows) are noticed in the patient. This latter cluster was constituted of CD38^{hi} cells, suggesting a shift towards differentiated B cells in septic shock patients.

Literature cited

1. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* 2017;377:414-417.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM and others. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-10.
3. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:259-72.
4. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* 2016;113:159-66.
5. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med* 2012;40:754-61.
6. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2014;5:4-11.
7. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013;369:840-51.
8. Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet* 2010;376:1339-46.
9. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16045.
10. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2017;17:407-420.
11. Torio CM, Moore BJ. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013: Statistical Brief #204. 2006.
12. Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest* 2016;126:23-31.
13. Shankar-Hari M, Rubenfeld GD. Understanding Long-Term Outcomes Following Sepsis: Implications and Challenges. *Curr Infect Dis Rep* 2016;18:37.
14. Kennelly PJ, Martin-Loeches I. Long term mortality following sepsis. *Ann Transl Med* 2016;4:387.
15. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* 2014;40:463-75.
16. Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, Kelly R, Rode H, Gordon J, MacLean LD. Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg* 1977;186:241-50.
17. MacLean LD, Meakins JL, Taguchi K, Duignan JP, Dhillon KS, Gordon J. Host resistance in sepsis and trauma. *Ann Surg* 1975;182:207-17.
18. Christou NV, Meakins JL, Gordon J, Yee J, Hassan-Zahraee M, Nohr CW, Shizgal HM, MacLean LD. The delayed hypersensitivity response and host resistance in surgical patients. 20 years later. *Ann Surg* 1995;222:534-46.
19. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991;88:1747-54.
20. Zeni F, Freeman B, Natanson C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med* 1997;25:1095-100.
21. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:316-21.
22. Pugin J. Sepsis and the immune response. *Intensive Care Med* 1999;25:1027-8.
23. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 2008;14:64-78.

24. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013;13:260-8.
25. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013;13:862-74.
26. Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med* 2014;20:195-203.
27. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* 2018;14:121-137.
28. Hotchkiss RS, Moldawer LL. Parallels between cancer and infectious disease. *N Engl J Med* 2014;371:380-3.
29. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;3:678-81.
30. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 2013;25:477-83.
31. Monneret G, Venet F. Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;90:376-86.
32. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32:1175-83.
33. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohe J, Vanhems P, Monneret G. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 2010;36:1859-66.
34. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H and others. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:640-8.
35. Pinder EM, Rostron AJ, Hellyer TP, Ruchaud-Sparagano MH, Scott J, Macfarlane JG, Wiscombe S, Widdrington JD, Roy AI, Linnett VC and others. Randomised controlled trial of GM-CSF in critically ill patients with impaired neutrophil phagocytosis. *Thorax* 2018;73:918-925.
36. Remy S, Gossez M, Belot A, Hayman J, Portefaix A, Venet F, Javouhey E, Monneret G. Massive increase in monocyte HLA-DR expression can be used to discriminate between septic shock and hemophagocytic lymphohistiocytosis-induced shock. *Crit Care* 2018;22:213.
37. Welte T, Dellinger RP, Ebelt H, Ferrer M, Opal SM, Singer M, Vincent JL, Werdan K, Martin-Loeches I, Almirall J and others. Efficacy and safety of trimodulin, a novel polyclonal antibody preparation, in patients with severe community-acquired pneumonia: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter, phase II trial (CIGMA study). *Intensive Care Med* 2018;44:438-448.
38. Berlot G, Vassallo CM, Busetto N, Nieto Yabar M, Istrati T, Baronio S, Quarantotto G, Bixio M, Barbati G, Dattola R and others. Effects of the timing of administration of IgM- and IgA-enriched intravenous polyclonal immunoglobulins on the outcome of septic shock patients. *Ann Intensive Care* 2018;8:122.
39. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, Amdur RL, Zhao H, Dinarello CA, Cron RQ, Opal SM. Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Crit Care Med* 2016;44:275-81.
40. Docke WD, Hoflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P and others. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 2005;51:2341-7.

41. Demaret J, Walencik A, Jacob MC, Timsit JF, Venet F, Lepape A, Monneret G. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84:59-62.
42. Zouiouich M, Gossez M, Venet F, Rimmele T, Monneret G. Automated bedside flow cytometer for mHLA-DR expression measurement: a comparison study with reference protocol. *Intensive Care Med Exp* 2017;5:39.
43. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis MA, Plassais J, Jallades L, Malcus C, Poitevin-Later F, Textoris J, Lepape A and others. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2015;98:1081-90.
44. Guerin E, Orabona M, Raquil MA, Giraudeau B, Bellier R, Gibot S, Bene MC, Lacombe F, Droin N, Solary E and others. Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit Care Med* 2014;42:2007-18.
45. Ost M, Singh A, Peschel A, Mehling R, Rieber N, Hartl D. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:37.
46. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 2017;5:3-8.
47. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* 2018;19:108-119.
48. Uhel F, Azzaoui I, Gregoire M, Pangault C, Dulong J, Tadie JM, Gacouin A, Camus C, Cynober L, Fest T and others. Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:315-327.
49. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S and others. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* 2016;7:12150.
50. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230-51.
51. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drenou B. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002;18:487-94.
52. Castellino DJ, McNair P, Kay TW. Lymphocytopenia in a hospital population--what does it signify? *Aust N Z J Med* 1997;27:170-4.
53. Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis MA, Darbon R, Allombert C, Mougin B, Malcus C, Poitevin-Later F and others. Early Assessment of Leukocyte Alterations at Diagnosis of Septic Shock. *Shock* 2010;34:358-363.
54. Adrie C, Lugosi M, Sonnevile R, Souweine B, Ruckly S, Cartier JC, Garrouste-Orgeas M, Schwebel C, Timsit JF, group Os. Persistent lymphopenia is a risk factor for ICU-acquired infections and for death in ICU patients with sustained hypotension at admission. *Ann Intensive Care* 2017;7:30.
55. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* 2014;42:383-91.
56. Daix T, Guerin E, Tavernier E, Mercier E, Gissot V, Herault O, Mira JP, Dumas F, Chapuis N, Guitton C and others. Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest* 2018;154:617-627.
57. Girardot T, Rimmele T, Venet F, Monneret G. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis* 2016;22:295-305.
58. Francois B, Jeannet R, Daix T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, Monneret G, Rimmele T, Blood T, Morre M and others. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 2018;3:e98960.
59. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193:1303-10.

60. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001;193:1285-94.
61. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
62. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-6.
63. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, Lepape A. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* 2003;31:2068-71.
64. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 2004;32:2329-31.
65. Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, Ayala A. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol* 2008;83:523-35.
66. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009;35:678-86.
67. Pitoiset F, Barbie M, Monneret G, Braudeau C, Pochard P, Pellegrin I, Trauet J, Labalette M, Klatzmann D, Rosenzwajg M. A standardized flow cytometry procedure for the monitoring of regulatory T cells in clinical trials. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94:621-626.
68. Conway Morris A, Datta D, Shankar-Hari M, Stephen J, Weir CJ, Rennie J, Antonelli J, Bateman A, Warner N, Judge K and others. Cell-surface signatures of immune dysfunction risk-stratify critically ill patients: INFECT study. *Intensive Care Med* 2018;44:627-635.
69. Gustave CA, Gossez M, Demaret J, Rimmelé T, Lepape A, Malcus C, Poitevin-Later F, Jallades L, Textoris J, Monneret G and others. Septic Shock Shapes B Cell Response toward an Exhausted-like/Immunoregulatory Profile in Patients. *J Immunol* 2018;200:2418-2425.
70. Gossez M, Rimmelé T, Andrieu T, Debord S, Bayle F, Malcus C, Poitevin-Later F, Monneret G, Venet F. Proof of concept study of mass cytometry in septic shock patients reveals novel immune alterations. *Sci Rep* 2018;8:17296.
71. Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol* 2017;47:765-779.
72. Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, Swan R, Kherouf H, Monneret G, Chung CS and others. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:6303-8.
73. Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, Malcus C, Cheron A, Allaouchiche B, Gueyffier F and others. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care* 2011;15:R99.
74. Chang K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C, Sato B, Rasche D, Wilson S, Robbins P, Ulbrandt N, Suzich J, Green J and others. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit Care* 2014;18:R3.
75. Patera AC, Drewry AM, Chang K, Beiter ER, Osborne D, Hotchkiss RS. Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol* 2016;100:1239-1254.
76. Patil NK, Guo Y, Luan L, Sherwood ER. Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis. *Int J Mol Sci* 2017;18:2413.
77. Segre E, Fullerton JN. Stimulated Whole Blood Cytokine Release as a Biomarker of Immunosuppression in the Critically Ill: The Need for a Standardized Methodology. *Shock* 2016;45:490-4.

78. van Vught LA, Wiewel MA, Hoogendijk AJ, Scicluna BP, Belkasim-Bohoudi H, Horn J, Schultz MJ, van der Poll T. Reduced Responsiveness of Blood Leukocytes to Lipopolysaccharide Does not Predict Nosocomial Infections in Critically Ill Patients. *Shock* 2015;44:110-4.
79. Monneret G, Demaret J, Gossez M, Reverdiau E, Malergue F, Rimmele T, Venet F. Novel Approach in Monocyte Intracellular TNF Measurement: Application to Sepsis-Induced Immune Alterations. *Shock* 2016;47:318-322.
80. Letessier W, Demaret J, Gossez M, Allam C, Venet F, Rimmele T, Monneret G. Decreased intra-lymphocyte cytokines measurement in septic shock patients: A proof of concept study in whole blood. *Cytokine* 2018;104:78-84.
81. Hu WS, Lin CL. Acute critical illness and cancer risk: Implications from a nationwide population based study in Asia. *Int J Cardiol* 2018;270:319-323.
82. Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:1287-93.
83. Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJ, Furman D, Shen-Orr S, Dekker CL, Swan GE, Butte AJ and others. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* 2015;160:37-47.
84. Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus DC, Calandra T, Jaton K, Giulieri S, Delaloye J, Opal S and others. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis* 2015;15:581-614.
85. Perner A, Gordon AC, Angus DC, Lamontagne F, Machado F, Russell JA, Timsit JF, Marshall JC, Myburgh J, Shankar-Hari M and others. The intensive care medicine research agenda on septic shock. *Intensive Care Med* 2017;43:1294-1305.
86. Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:903-16.
87. Almansa R, Martin S, Martin-Fernandez M, Heredia-Rodriguez M, Gomez-Sanchez E, Aragon M, Andres C, Calvo D, Rico-Feijoo J, Esteban-Velasco MC and others. Combined quantification of procalcitonin and HLA-DR improves sepsis detection in surgical patients. *Sci Rep* 2018;8:11999.
88. Frattari A, Polilli E, Primiterra V, Savini V, Ursini T, Di Iorio G, Parruti G. Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in critical patients at ICU admission: A preliminary investigation of their role in the prediction of sepsis during ICU stay. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2018;32:2058738418792310.
89. Solly F, Rigollet L, Baseggio L, Guy J, Borgeot J, Guerin E, Debliquis A, Drenou B, Campos L, Lacombe F and others. Comparable flow cytometry data can be obtained with two types of instruments, Canto II, and Navios. A GEIL study. *Cytometry A* 2013;83:1066-72.
90. Shankar-Hari M, Datta D, Wilson J, Assi V, Stephen J, Weir CJ, Rennie J, Antonelli J, Bateman A, Felton JM and others. Early PREdiction of sepsis using leukocyte surface biomarkers: the ExPRES-sepsis cohort study. *Intensive Care Med* 2018;44:1836-1848.
91. Francois B, Jeannet R, Daix T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, Monneret G, Rimmele T, Blood T, Morre M and others. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 2018;3.
92. Moldawer LL, Hotchkiss R. Immunotherapy: It is not just for cancer anymore. *J Leukoc Biol* 2018;103:9-11.
93. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir el AD, Krutzik PO, Finck R, Bruggner RV, Melamed R, Trejo A, Ornatsky OI and others. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science* 2011;332:687-96.
94. Bjornson ZB, Nolan GP, Fantl WJ. Single-cell mass cytometry for analysis of immune system functional states. *Curr Opin Immunol* 2013;25:484-94.
95. Ornatsky O, Bandura D, Baranov V, Nitz M, Winnik MA, Tanner S. Highly multiparametric analysis by mass cytometry. *J Immunol Methods* 2010;361:1-20.

96. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, Antonov A, Kinach R, Lou X, Pavlov S, Vorobiev S, Dick JE, Tanner SD. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2009;81:6813-22.
97. Spitzer MH, Nolan GP. Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell* 2016;165:780-91.
98. Cheung P, Vallania F, Dvorak M, Chang SE, Schaffert S, Donato M, Rao AM, Mao R, Utz PJ, Khatri P and others. Single-cell epigenetics - Chromatin modification atlas unveiled by mass cytometry. *Clin Immunol* 2018;196:40-48.
99. Frei AP, Bava FA, Zunder ER, Hsieh EW, Chen SY, Nolan GP, Gherardini PF. Highly multiplexed simultaneous detection of RNAs and proteins in single cells. *Nat Methods* 2016;13:269-75.
100. Schulz D, Zanotelli VRT, Fischer JR, Schapiro D, Engler S, Lun XK, Jackson HW, Bodenmiller B. Simultaneous Multiplexed Imaging of mRNA and Proteins with Subcellular Resolution in Breast Cancer Tissue Samples by Mass Cytometry. *Cell Syst* 2018;6:531.
101. Baca Q, Cosma A, Nolan G, Gaudilliere B. The road ahead: Implementing mass cytometry in clinical studies, one cell at a time. *Cytometry B Clin Cytom* 2017;92:10-11.
102. Good Z, Sarno J, Jager A, Samusik N, Aghaeepour N, Simonds EF, White L, Lacayo NJ, Fantl WJ, Fazio G and others. Single-cell developmental classification of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia at diagnosis reveals predictors of relapse. *Nat Med* 2018;24:474-483.
103. Spitzer MH, Carmi Y, Reticker-Flynn NE, Kwek SS, Madhireddy D, Martins MM, Gherardini PF, Prestwood TR, Chabon J, Bendall SC and others. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168:487-502.
104. Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, Xu W, Harmon S, Giles JR, Wenz B and others. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature* 2017;545:60-65.
105. Nair N, Mei HE, Chen SY, Hale M, Nolan GP, Maecker HT, Genovese M, Fathman CG, Whiting CC. Mass cytometry as a platform for the discovery of cellular biomarkers to guide effective rheumatic disease therapy. *Arthritis Res Ther* 2015;17:127.
106. Furman D, Chang J, Lartigue L, Bolen CR, Haddad F, Gaudilliere B, Ganio EA, Fragiadakis GK, Spitzer MH, Douchet I and others. Expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states. *Nat Med* 2017;23:174-184.
107. Seshadri A, Brat GA, Yorkgitis BK, Keegan J, Dolan J, Salim A, Askari R, Lederer JA. Phenotyping the Immune Response to Trauma: A Multiparametric Systems Immunology Approach. *Crit Care Med* 2017;45:1523-1530.
108. Fragiadakis GK, Gaudilliere B, Ganio EA, Aghaeepour N, Tingle M, Nolan GP, Angst MS. Patient-specific Immune States before Surgery Are Strong Correlates of Surgical Recovery. *Anesthesiology* 2015;123:1241-55.
109. Gaudilliere B, Fragiadakis GK, Bruggner RV, Nicolau M, Finck R, Tingle M, Silva J, Ganio EA, Yeh CG, Maloney WJ and others. Clinical recovery from surgery correlates with single-cell immune signatures. *Sci Transl Med* 2014;6:255.
110. Aghaeepour N, Ganio EA, McIlwain D, Tsai AS, Tingle M, Van Gassen S, Gaudilliere DK, Baca Q, McNeil L, Okada R and others. An immune clock of human pregnancy. *Sci Immunol* 2017;2.
111. Fragiadakis GK, Baca QJ, Gherardini PF, Ganio EA, Gaudilliere DK, Tingle M, Lancero HL, McNeil LS, Spitzer MH, Wong RJ and others. Mapping the Fetomaternal Peripheral Immune System at Term Pregnancy. *J Immunol* 2016;197:4482-4492.
112. Gaudilliere B, Angst MS, Hotchkiss RS. Deep Immune Profiling in Trauma and Sepsis: Flow Is the Way to Go! *Crit Care Med* 2017;45:1577-1578.
113. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, Hayden DL, Hennessy L, Moore EE, Minei JP and others. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 2011;208:2581-90.

114. Aghaeepour N, Simonds EF, Knapp D, Bruggner RV, Sachs K, Culos A, Gherardini PF, Samusik N, Fragiadakis GK, Bendall SC and others. GateFinder: projection-based gating strategy optimization for flow and mass cytometry. *Bioinformatics* 2018;34:4131-4133.
115. Newell EW, Cheng Y. Mass cytometry: blessed with the curse of dimensionality. *Nat Immunol* 2016;17:890-5.
116. Finak G, Langweiler M, Jaimes M, Malek M, Taghiyar J, Korin Y, Raddassi K, Devine L, Obermoser G, Pekalski ML and others. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Sci Rep* 2016;6:20686.
117. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012;12:191-200.
118. Aghaeepour N, Chattopadhyay P, Chikina M, Dhaene T, Van Gassen S, Kursu M, Lambrecht BN, Malek M, McLachlan GJ, Qian Y and others. A benchmark for evaluation of algorithms for identification of cellular correlates of clinical outcomes. *Cytometry A* 2015;89:16-21.
119. Weber LM, Robinson MD. Comparison of clustering methods for high-dimensional single-cell flow and mass cytometry data. *Cytometry A* 2016;89:1084-1096.
120. Ghaemi MS, DiGiulio DB, Contrepois K, Callahan B, Ngo TTM, Lee-McMullen B, Lehallier B, Robaczewska A, McIlwain D, Rosenberg-Hasson Y and others. Multiomics modeling of the immunome, transcriptome, microbiome, proteome and metabolome adaptations during human pregnancy. *Bioinformatics* 2019;35:95-103.
121. Ghaemi MS, DiGiulio DB, Contrepois K. Multiomics modeling of the immunome, transcriptome, microbiome, proteome and metabolome adaptations during human pregnancy. *Bioinformatics* 2018:537.
122. Olin A, Henckel E, Chen Y, Lakshmikanth T, Pou C, Mikes J, Gustafsson A, Bernhardsson AK, Zhang C, Bohlin K and others. Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell* 2018;174:1277-1292
123. Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings DP, Gutensohn K, Jung R, Schneider CG, Pothmann W, Brassel AK, Schulte Am Esch J. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2003;29:646-51.
124. Nakos G, Malamou-Mitsi VD, Lachana A, Karassavoglou A, Kitsioulis E, Agnandi N, Lekka ME. Immunoparalysis in patients with severe trauma and the effect of inhaled interferon-gamma. *Crit Care Med* 2002;30:1488-94.
125. Grimaldi D, Pradier O, Hotchkiss RS, Vincent JL. Nivolumab plus interferon-gamma in the treatment of intractable mucormycosis. *Lancet Infect Dis* 2017;17:18.
126. Lukaszewicz AC, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 2009;37:2746-52.
127. Nalos M, Santner-Nanan B, Parnell G, Tang B, McLean AS, Nanan R. Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:110-2.
128. Protti A, L'Acqua C, Spinelli E, Lissoni A, Porretti L, Frugoni C, Maraschini A, Gattinoni L, Bonara P. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor for non-resolving legionellosis. *Anaesth Intensive Care* 2014;42:804-6.
129. Skirecki T, Kawiak J, Hoser G, Tarnowski W, Zlotorowicz M, Zielinska-Borkowska U. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on circulating immune and stem cells in septic shock: revisit the basics and consider giving it another chance. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:217-9.
130. Hall MW, Knatz NL, Vetterly C, Tomarello S, Wewers MD, Volk HD, Carcillo JA. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 2011;37:525-32.

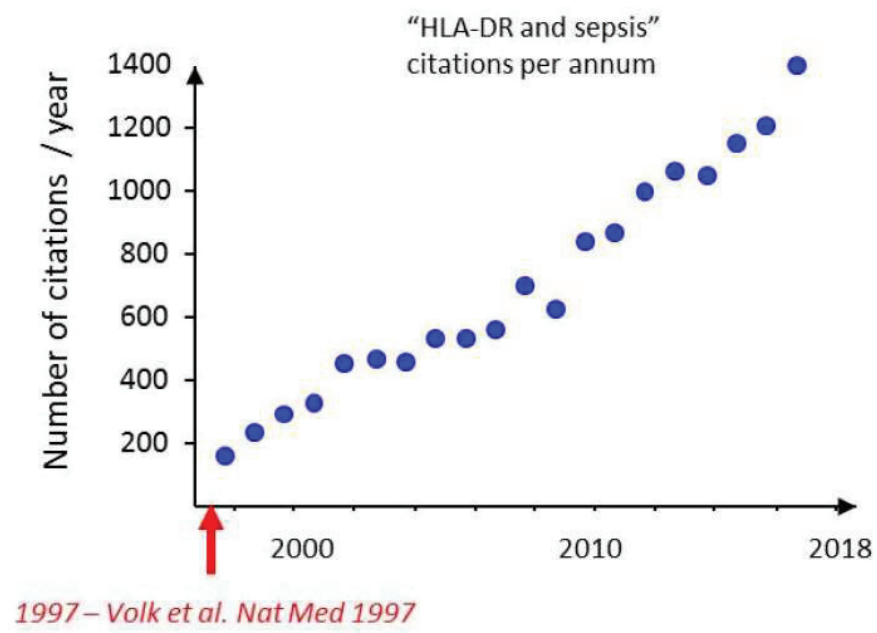


Figure 1. "HLA-DR and sepsis" citations over years.

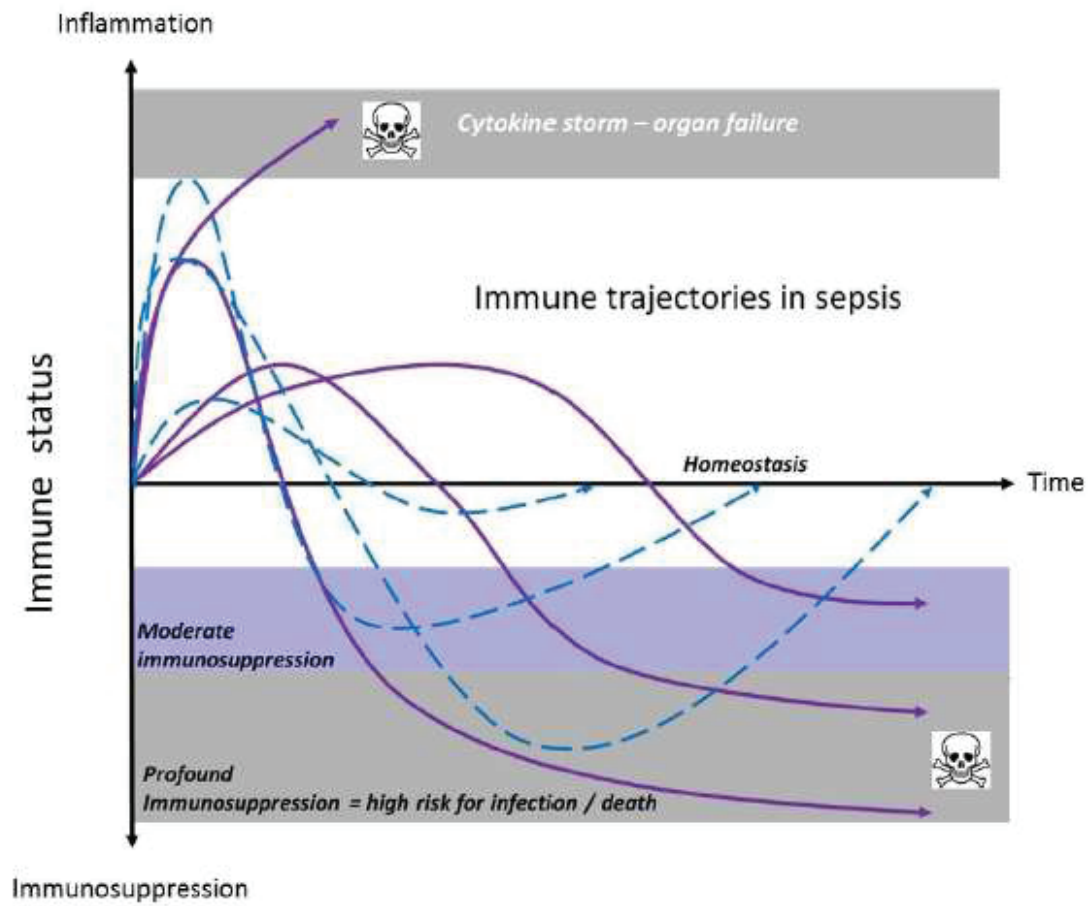


Figure 2. Immune trajectories in sepsis.

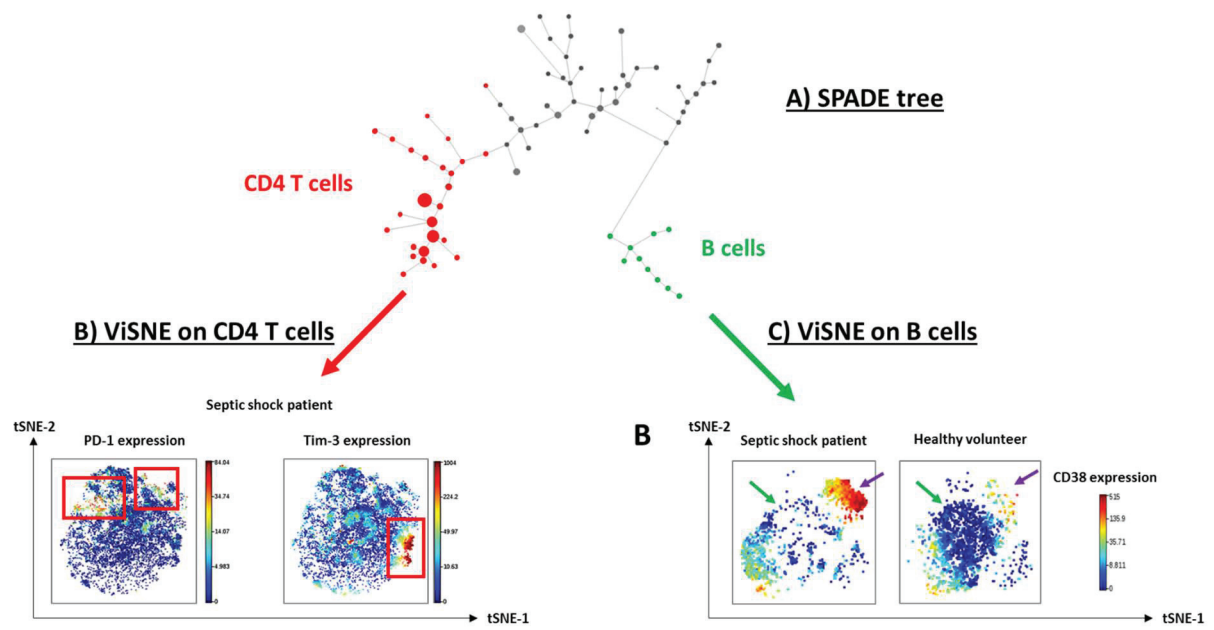


Figure 3. Illustrative example of unsupervised analysis of CyTOF results in healthy volunteers and septic patients.

ANNEXE 2

IL-7 and Its Beneficial Role in Sepsis-Induced T Lymphocyte Dysfunction

Charles de Roquetaillade,^a Guillaume Monneret,^{a,b} Morgane Gossez,^{a,b} & Fabienne Venet^{a,b,*}

^aEA7426 "Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression (PI3)", Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; ^bImmunology Laboratory, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

*Address all correspondence to: Dr. Fabienne Venet, Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot–Hospices Civils de Lyon, 5 Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France; Tel.: (+33) 4 72 11 97 46; Fax: (+33) 4 72 11 97 53, E-mail: fabienne.venet@chu-lyon.fr

ABSTRACT: Sepsis, defined as life-threatening organ dysfunction caused by dysregulated host response to infection, has recently been acknowledged as a worldwide health priority. Sepsis remains the leading cause of mortality in intensive care units and accounts for 6 million deaths every year. Few therapeutic options targeting host immune response in sepsis have demonstrated their efficacy so far. Increasing evidence suggests that a profound immune suppression develops following sepsis, affecting innate and adaptive immune response, of which intensity and duration is associated with increased risk of death and nosocomial infection. Immunostimulant treatments are thus now evaluated in sepsis, and recombinant human IL-7 (rhIL-7) represents a promising candidate. rhIL-7 has been evaluated in several clinical trials in patients with altered lymphocytic responses (HIV infection, hematopoietic stem cell transplantation, and cancer). Recent studies in animal models and in patients' samples *ex vivo* demonstrated its efficacy in improving sepsis-induced T cell alterations. Finally, the first clinical trial evaluating rhIL-7 in septic shock patients has just been published. This review will discuss the use of rhIL-7 to treat sepsis-induced T cell dysfunction by introducing the pathophysiology of sepsis and sepsis-related lymphocyte alterations before focusing on rhIL-7 and its potential use of as a therapeutic intervention in patients.

KEY WORDS: sepsis, septic shock, IL-7, immunotherapy, lymphocyte exhaustion

ABBREVIATIONS: ICU, intensive care unit; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; DC, dendritic cell; AIDS, acquired immune deficiency syndrome; HIV, human immunodeficiency virus; Treg, regulatory T cell; TGF, tumor growth factor; APC, antigen-presenting cell; TCR, T cell receptor; PD1, programmed cell death receptor 1; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; HLA, human leukocyte antigen

I. INTRODUCTION

In May 2017, the World Health Organization (WHO) recognized sepsis as a global health priority by adopting a resolution to improve the prevention, diagnosis, and management of this deadly disease.¹ Despite advances in medical care, sepsis remains the leading cause of death in intensive care units (ICUs) and still accounts for one of the top 10 leading causes of death worldwide.² Sepsis was recently redefined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection.³ In this new definition, even if infection remains the trigger of the pathology, the aberrant host immune response is now at the center of the pathophysiology of sepsis.^{3,4}

The occurrence of sepsis-induced immune alterations was first reported 40 years ago with the description by MacLean et al. of the negative

intradermal reaction to recall antigens in postoperative and postinjury patients.⁵ In addition, following major surgery, patients presenting with altered skin-test response—which may be considered an *in vivo* immune functional test—showed increased in-hospital mortality and were more prone to develop nosocomial infections. In spite of these findings, clinicians have focused for decades on mitigating the unbridled initial inflammation induced by infection which was thought to be the central cause of mortality after sepsis. Despite promising results in animal models, for example using anti-interleukin 1 (anti-IL-1) and antitumor necrosis factor (anti-TNF) antibody infusions, such beneficial results could never be reproduced in patients.^{6,7} In total, over 40 clinical trials evaluating numerous anti-inflammatory therapeutic strategies relentlessly failed to show any benefit in sepsis.⁸

One of the most plausible explanations for this failure is that the majority of patients who die of sepsis do not succumb from the initial overwhelming cytokine storm.⁹ Indeed, fewer than 30% of sepsis-related deaths occur during the initial three days after diagnosis.¹⁰ If carefully identified, only those very severe patients, for example patients with meningococcaemia, might benefit from anti-inflammatory interventions.¹¹ In practice, the majority of deaths after sepsis occur later after admission and may be related to secondary, opportunistic bacterial infections, viral reactivation, or fungemia as a consequence of a severely suppressed immune status.^{9,12}

These observations have led researchers to investigate immune-stimulating intervention as a novel therapeutic strategy in sepsis in order to restore host defense against pathogens and prevent opportunistic infections. Among potential candidates, IL-7 is one of the very first treatments to target sepsis-induced T lymphocyte dysfunction and thus appears to be a very promising candidate in this indication.

In this review, we discuss the main features of sepsis-induced T lymphocyte alterations. We present the physiology of IL-7 and the rationale for its use in sepsis. Finally, we discuss combination therapy and biomarkers to stratify patients for immune-stimulating interventions and immunomonitoring.

II. SEPSIS-INDUCED T CELL ALTERATIONS

Sepsis induces major alterations of innate immune cells such as neutrophils, dendritic cells (DCs), and monocytes, which appear to play a major role in the pathophysiology of the disease. Such immune dysfunctions are not discussed in the present review as they have been reviewed elsewhere.^{10,13,14}

The first evidence of adaptive immune response impairment after sepsis dates back to 1999, when researchers highlighted profound lymphocyte apoptosis in patients.¹⁵ This major apoptosis-induced depletion of circulating lymphocytes leads to lymphopenia in septic patients that is often as severe as observed in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS).¹⁶ Every lymphocyte subpopulation, including CD4⁺ and CD8⁺ T cells but also NK cells and B cells, is subject to sepsis-induced apoptosis except for the CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ T regulatory (Treg) cell

compartment.^{17,18} Sepsis-induced lymphocyte apoptosis is caused by both intrinsic (mitochondria-mediated) and extrinsic (death receptor-mediated) apoptotic pathways.¹⁹ This severe and persistent lymphopenia is associated with increased risk of deleterious outcomes (death, nosocomial infections).^{19,20} Finally, apoptotic debris participates in the maintenance of immune suppression through induction of lymphocyte anergy and Th2-biased response, and through induction of the release of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and tumor growth factor β (TGF- β) by antigen-presenting cells (APCs).²¹

Apart from massive lymphocyte apoptosis, sepsis also induces a progressive loss of function of remaining circulating lymphocytes which can be related to lymphocyte exhaustion. This phenomenon was first described in the context of chronic viral infection in mice.²² However, it is now acknowledged that many situations of prolonged antigen exposure can lead to lymphocyte exhaustion in the form of cancer and septic shock.^{10,23} Hallmarks of T lymphocyte exhaustion include reduced IL-2 production and proliferative capacities, decreased T cell receptor (TCR) diversity, and increased expressions of co-inhibitory receptors such as programmed cell death 1 (PD-1), cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4), T cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3 (TIM-3), and lymphocyte activation gene 3 protein (LAG-3).²³

Sepsis is also characterized by an increase in Treg proportion among circulating lymphocytes, which has been associated with poor outcomes.¹⁸ Treg participates in the altered immune status following sepsis, for example by promoting monocyte apoptosis and endotoxin tolerance²⁴ or by inhibiting T lymphocyte proliferation.²⁵ Sepsis-induced Treg expansion has been associated with long-lasting immune suppression after sepsis, thus favoring reinfections and tumor growth.^{26–28}

The thymus is strongly affected by sepsis. It has, for example, been demonstrated to be a specific target of several pathogens including viruses (HIV, measles), protozoan parasites (*Trypanosoma cruzi*), and fungi.²⁹ It is also highly affected by inflammation leading to its involution and atrophy. Indeed, sepsis induces a profound apoptosis of double-positive CD4⁺CD8⁺ thymocytes³⁰ and a reduction in

naïve T cell output.³¹ This most likely participates in the profound reduction in T cell repertoire diversity and in the long-term vulnerability to reinfections of septic patients.³² Notably, such reduction in TCR repertoire diversity was also observed in various clinical conditions such as senescence, bone marrow transplantation, organ transplantation, graft rejection, and HIV infection in association with increased susceptibility to opportunistic infections, viral reactivations, and mortality.^{33,34}

III. IMMUNE STIMULATION FOR SEPTIC PATIENTS: WHERE DO WE STAND?

Based on the paradigm shift in the comprehension and description of sepsis pathophysiology, immunotherapy recently emerged as a major therapeutic option in the treatment of sepsis in contrast with decades of anti-inflammatory approaches.¹⁰ A few different therapeutic strategies targeting innate or adaptive immune responses have been evaluated in preliminary clinical trials.

A. IFN γ and GM-CSF: Godfathers of Immunotherapy in Sepsis

IFN γ and GM-CSF were the first immunostimulant molecules to be tested in septic patients. Those two cytokines mainly target the innate immune response. IFN γ is the prototypical Th1 cytokine and exerts major function on monocyte activation by increasing monocyte antigen presentation and phagocytic capacities. The first use of IFN γ in the clinical setting in sepsis was reported in 1997 in an open-label study in patients with reduced mHLA-DR expression. The results of this initial trial were promising, with improved monocyte functionality and clearance of sepsis in treated patients.³⁵ IFN γ has since been evaluated in invasive fungal infections with a good tolerance profile.^{36–39} The ongoing PROVIDE trial (NCT03332225) is evaluating the ability of IFN γ to reduce mortality in patients with septic shock stratified on the basis of decreased monocytic HLA-DR expression. However, despite these promising preliminary data, we are still lacking a sufficiently powered clinical trial to substantiate those results.

GM-CSF is a major hematopoietic growth factor that exerts its function on the myeloid lineage, essentially by stimulating the production of neutrophils and monocytes by the bone marrow. GM-CSF also stimulates the activation and survival of monocytes.⁴⁰ It has been used for decades in hematological patients with persistent leuco/neutropenia with a good tolerance profile. Its use in critically ill patients has been documented in pediatric ICUs and in case series showing a benefit in term of nosocomial infection occurrence.^{41,42} In 2009, Meisel et al. showed GM-CSF therapy in septic patients with decreased monocyte HLA-DR expression to be safe and effective for restoring monocytic immunocompetence and was associated with shorter mechanical ventilation time and hospital/ICU stays.⁴³ The GRID trial, which was recently completed in 2018, might bring some additional results on the efficacy of this therapeutic strategy in sepsis (NCT02361528). Interestingly, the use of IFN γ in addition to GM-CSF has been documented in four patients with refractory fungal infections. Results of this combination therapy showed good clinical recovery among patients and no further infection reported.⁴⁴

B. Anti-PD1 Therapy: Drug Repositioning from Oncology

As mentioned previously, increased expressions of exhaustion markers such as PD-1 or PD-L1 have been described for circulating T lymphocytes and monocytes from septic shock patients. Increased PD-1 and PD-L1 expressions on circulating monocytes have been associated with increased risk of secondary infection and death in septic patients.^{45,46} Thus, we can postulate that therapies targeting these pathways that are currently revolutionizing the treatment of cancer might positively affect outcomes in patients with sepsis. However, no large clinical trial investigating the possible benefit of anti-PD-1 therapy in sepsis has thus far been published. A phase I clinical study including 38 septic shock patients receiving nivolumab was recently completed (NCT02960854). Another phase Ib trial evaluating the use in severe sepsis of BMS-936559, a novel anti-PD-L1 antibody was presented with encouraging results (NCT02576457).⁴⁷ In addition, one

case report described the use of nivolumab to treat a patient suffering from refractory fungal infection with a favorable outcome.³⁸ This was in the context of a compassionate combination therapy with IFN γ in one patient with invasive mucormycosis infection (see below).

IV. IMMUNE STIMULATION FOR SEPTIC PATIENTS: rhIL-7, THE NEWCOMER

A. IL-7 and IL-7 Receptor Physiology

Interleukin 7 is a 25-kDa protein that exerts a non-redundant role in T cell development and function. Nonhematopoietic stromal cells are the main producers of this molecule, followed by dendritic cells to a smaller extent.⁴⁸ IL-7 mediates its signaling through Janus kinase 1 (JAK1) and JAK3 signaling leading to STAT5 phosphorylation, as well as through the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) –Akt pathway.⁴⁹ As a consequence, IL-7 improves T cell survival and effector functions.^{48,50} Its presence is required at the very early stages of T cell development and is central for regulating homeostasis of naïve and memory T cells. This is illustrated by the severe combined immunodeficiency (SCID) syndrome in patients with IL-7R loss-of-function mutations.⁵¹ However, although such patients present with a complete lack of T lymphocyte development; B cell ontogeny is not markedly altered. This suggests that IL-7 is not absolutely mandatory for B cell development.⁵¹ IL-7 is also required for development and functions of some lymphocyte subpopulations of the innate immune system such as $\gamma\delta$ cells⁵² and NK-T cells.⁵³ Thus, it has emerged as a master controller of both innate and adaptive immune responses.⁵⁴

IL-7 is part of the common γ chain (γ_c) cytokine family, which includes IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21.⁵⁵ It binds to its cell-surface receptor composed of a specific α chain, IL-7R α (CD127), and the common class I cytokine chain γ_c (CD132).⁵⁵ Whereas the common chain is expressed by every hematopoietic cell, IL-7R α is mostly expressed on lymphoid cells: thymocytes, T-cells, and pre-B cells. CD127 is poorly expressed on Tregs, and its expression level inversely correlates with Tregs' suppressive functions.⁵⁶

In contrast to other class I cytokines that increase cell surface receptor expression after TCR stimulation, IL-7R α expression is downregulated on T lymphocytes after activation.⁵⁷ This suggests that IL-7 mediates its effect mostly on naïve and memory T lymphocytes rather than on effector, activated T cells. Recent studies described the presence in plasma of a soluble form of IL-7R (sCD127). Its exact role in health and disease remains controversial. Some studies reported its effect in decreasing IL-7 activity, for example by acting as a decoy receptor to deprive remaining lymphocytes of IL-7.⁵⁸ Other groups showed its potentiation activity on IL-7 functions.⁵⁹

B. IL-7 Homeostasis in Response to Aggression

IL-7 is a limitative resource under physiological conditions and its concentration is tightly regulated. Lymphocytes have to compete for IL-7-mediated survival.⁶⁰ When T cell numbers decrease, due to congenital or acquired immunodeficiency or following treatment (e.g., chemotherapy), the amount of IL-7 available per T cell increases. Thus, elevated seric and tissue levels of IL-7 are inversely correlated with circulating T cell numbers.^{61,62} This results in an enhanced survival signal through the IL-7R complex in remaining lymphocytes and, if sufficiently strong, also in a proliferation signal. Therefore, T cells transferred into a lymphopenic environment undergo a unique type of proliferation called lymphopenia-induced proliferation (LIP).⁶³

In sepsis, IL-7 regulation is complex and has not been deeply investigated. Osteoblast production of IL-7 seems to play a major role during sepsis. In a recent study, Terashima et al. found that osteoblast depletion or suppression of IL-7 production by osteoblasts reproduce a lymphopenic phenotype like that observed after sepsis.⁶⁴ In addition, while IL-7 levels in plasma remain surprisingly normal or only slightly affected in patients, sepsis typically induces massive apoptosis-induced depletion of lymphocytes leading to profound lymphopenia.^{65,66} We postulate that the profound metabolic defect and exhausted phenotype of remaining lymphocytes in patients might explain the absence of LIP in sepsis.^{67,68}

IL-7-R expression on lymphocytes is not markedly regulated after sepsis. Indeed, Boomer et al. noticed a trend toward reduced CD127 expression on lymphocytes during sepsis whereas Venet et al. found no difference between patients and healthy volunteers.^{67,69} In addition, recent insights into CD127 receptor regulation demonstrated that the plasmatic concentration of the soluble form of the receptor (sCD127) was decreased in ICU patients compared to healthy volunteers but with a higher concentration in nonsurvivors compared to survivors.⁷⁰ We hypothesize that sCD127 at such elevated levels in nonsurvivors might bind to circulating IL-7, thus depriving the remaining lymphocytes in IL-7. This may be partly responsible for the worsening of sepsis-induced immunosuppression in these patients. Such a hypothesis remains to be demonstrated.

This suggests that endogenous levels of IL-7 may be insufficient to counteract the immune-suppressive environment induced by sepsis, but also supports the hypothesis that the IL-7 pathway is not overtly altered and could be activated in sepsis. This reinforces the rationale for exogenous administration of this lymphocyte growth factor in this clinical context.

V. rhIL-7 CLINICAL TRIALS (OTHER THAN SEPSIS)

Due to its immuno-stimulatory effects on lymphoid cells, IL-7 is of particular interest in the treatment of many clinical conditions affecting adaptive immune response at quantitative and qualitative levels. This includes oncohematology, HIV infection, genetic immune disorders, vaccination, and immune senescence. Ongoing clinical trials assessing the benefit of rhIL-7 administration are summarized in Table 1.

In 1991, Morrissey et al. demonstrated that injections of recombinant human recombinant IL-7 (rhIL-7) hasten lymphocyte repopulation following cyclophosphamide injection in mice.⁷¹ Since then, rhIL-7 has been evaluated in various clinical trials to favor the restoration of a normal lymphocyte count in cancer patients following aggressive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation

(HSCT) with some success.^{72,73} For example, in a phase I clinical trial, Alpdogan and colleagues treated twelve patients with rhIL-7 following HSCT. The rhIL-7 treatment showed a very good tolerance profile with no major adverse events and was efficient in increasing CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cell numbers, with a major effect on the memory T cell subset. It also positively affected TCR repertoire diversity. Interestingly, rhIL-7 therapy showed no effect on Treg, NK, or B cell subpopulations.^{74–77}

rhIL-7 has also been used in various clinical cases of idiopathic or genetic lymphopenia with a constant positive effect on CD4⁺ and CD8⁺ T cell numbers.⁷⁸ Functional analyses showed that these rhIL-7-induced lymphocytes were fully functional after stimulation (cytokine production).⁷⁸

The pertinence of rhIL-7 treatment in HIV-infected patients is up for debate. The use of rhIL-7 to treat HIV-infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PMLE) due to John Cunningham polyomavirus infection has been documented in several case reports with very encouraging results.^{79–82} In almost all cases, patients demonstrated clinical improvement and an increase in T cell count with long-lasting effects. The use of rhIL-7 to treat AIDS itself has also been evaluated in several clinical trials.^{83–85} However, its proliferative effect on CD4⁺ lymphocytes, which constitute the viral reservoir, is associated with an increase in viral load.^{83,84,86–88} Thus, rhIL-7 treatment in HIV-infected patients with AIDS should be discouraged.

Cytokine therapy such as rhIL-7 may become a part of immunotherapy against cancer in the next few years—perhaps, for example, in the treatment of poorly immunogenic tumors with low numbers of neoantigens.⁸⁹ In addition, its capacity to lower the immunogenic threshold of neoantigens could become useful in association with CAR T cell therapy. For example, in a recent case report, Zacharakis et al. used a combination of tumor-specific T cells and IL-2 to successfully treat a woman with multimetastatic breast cancer.⁹⁰ Along the same line, rhIL-7 could potentiate vaccine-induced antigen-specific T-cells against tumors.^{50,91} A clinical trial evaluating rhIL-7 in combination with sipuleucel-T, an anti-cancer vaccine, is ongoing (NCT01881867).

TABLE 1: Ongoing clinical trials of recombinant human interleukin-7

NCT Number	Title	Eligible Population	Interventions	Start	Status
NCT01025596 (ECLIPSE 1)	Dose Escalation Study of rhIL-7 and Bi-Therapy in HCV Patients Resistant after 12 Weeks of Bi-Therapy	Hepatitis C	rh-IL-7 + ribavirine/peg-interferon	May 2007	Completed
NCT00923351	Therapy to Treat Ewing's Sarcoma, Rhabdomyosarcoma or Neuroblastoma	Neuroblastoma, sarcoma, and rhabdomyosarcoma	Antitumor vaccine +/- rh-IL-7	June 2007	Completed
NCT01025297 (Eclipse 2)	Dose Escalation Study of rhIL-7 and Bitherapy in HCV Genotype 1 or 4 Patients Resistant to Bitherapy Alone	Hepatitis C	rh-IL-7 + Ribavirine/Peg-interferon	July 2008	Unknown
NCT01024894 (ECLIPSE 3)	Dose Escalation Study of rhIL-7 and Bitherapy in Asiatic HCV Patients Resistant to Bitherapy	Hepatitis C	rh-IL-7 + Ribavirine/peg-interferon	January 2009	Unknown
NCT01881867	CYT107 after Vaccine Treatment (Provenge®) in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer	Refractory prostate cancer	rh-IL-7 + sipuleucel-T (Provenge)	September 2013	Active, not recruiting
NCT02860715	Clinical Trial of GX-I7 in Healthy Volunteers	Healthy volunteers	GX-I7 versus placebo	July 2016	Active, not recruiting
NCT02992834	Anti-CD19:TCrζ Chimeric Antigen Receptor-T Cells in the Treatment for CD19+ B Cell Lymphoma	Lymphoma, B cell	CAR T-cell therapy with IL-7/IL-15-pretreated CD19 cells versus IL-2-pretreated CD19 cells	December 2016	Not yet recruiting
NCT03144934	Safety and Tolerability of GX-I7 in HPV-Infected Female Volunteers	Human papillomavirus	GX-I7 versus placebo	February 2017	Recruiting

TABLE 1: (continued)

NCT Number	Title	Eligible Population	Interventions	Start	Status
NCT03513952	Atezolizumab and CYT107 in Treating Participants with Locally Advanced, Inoperable, or Metastatic Urothelial Carcinoma	Metastatic urothelial cancer	Atezolizumab + rh-IL-7	September 2018	Not yet recruiting
NCT02659800	IL-7 in Increasing Low CD4 Counts after Concurrent Radiation and Temozolomide Treatment in Patients with High Grade Gliomas	Malignant glioma	rh-IL-7	December 2018	Suspended

HCV, hepatitis C virus; rh-IL-7, recombinant human interleukin 7; CAR, chimeric antigen receptor; GX-17, protein drug recombinant human IL-7 and hybrid Fc; RCT: randomized clinical trial

Due to its stimulatory effect on the thymus and its capacity to induce naïve CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte proliferation, rhIL-7 is of interest in the treatment of age-related thymic atrophy and senescence and in the improvement of vaccine efficacy. Several experimental studies demonstrated the beneficial effect of exogenous IL-7 administration on thymopoiesis and generation of naïve T cells.^{92–95} Moreover, rhIL-7 administration was also associated with TCR repertoire diversity restoration in refractory cancer.⁹⁶ Interestingly, Levy et al. observed that HIV-infected patients with normal TCR diversity at baseline maintained stable TCR repertoire upon rhIL-7 treatment. In contrast, HIV-infected subjects with low baseline diversity showed an increased TCR repertoire after rhIL-7 injection.⁸⁴ In the context of neoantigen exposure such as anti-infectious vaccination, rhIL-7 could favor the generation of antigen-specific T cells.⁹⁷ Indeed, due to their high CD127 expression, antigen-specific T cells have been shown to be a preferential target of IL-7. rhIL-7 has, for example, been shown to increase memory T cell response following vaccinia virus vaccination in mice.⁸⁹ Thus, this cytokine may be a good candidate to rejuvenate thymic atrophy in the elderly as well as a novel vaccine adjuvant.^{89,91,97,98}

However, clinical trials assessing its beneficial effects on anti-infectious vaccine response and senescence have yet to be undertaken.

VI. rhIL-7 TREATMENT IN SEPSIS

A. Preclinical Data

Due to its antiapoptotic and lymphoproliferative properties, rhIL-7 appears as one of the most promising therapies to reverse sepsis-induced adaptive immune alterations (Fig. 1). Data in several murine and *ex vivo* models of sepsis described its effect on such alterations as successful.

1. Animal Studies

IL-7 administration has continually demonstrated its ability to improve outcomes in animal models of sepsis. Hotchkiss and colleagues reported the use of IL-7 in the treatment of mice after cecal ligation puncture (CLP) and in two-hit models of bacterial and fungal infections.^{99–102} Their results show that rhIL-7 decreases T cell apoptosis and restore lymphocyte function such as improved IFN γ production in association with improved survival. IL-7 also

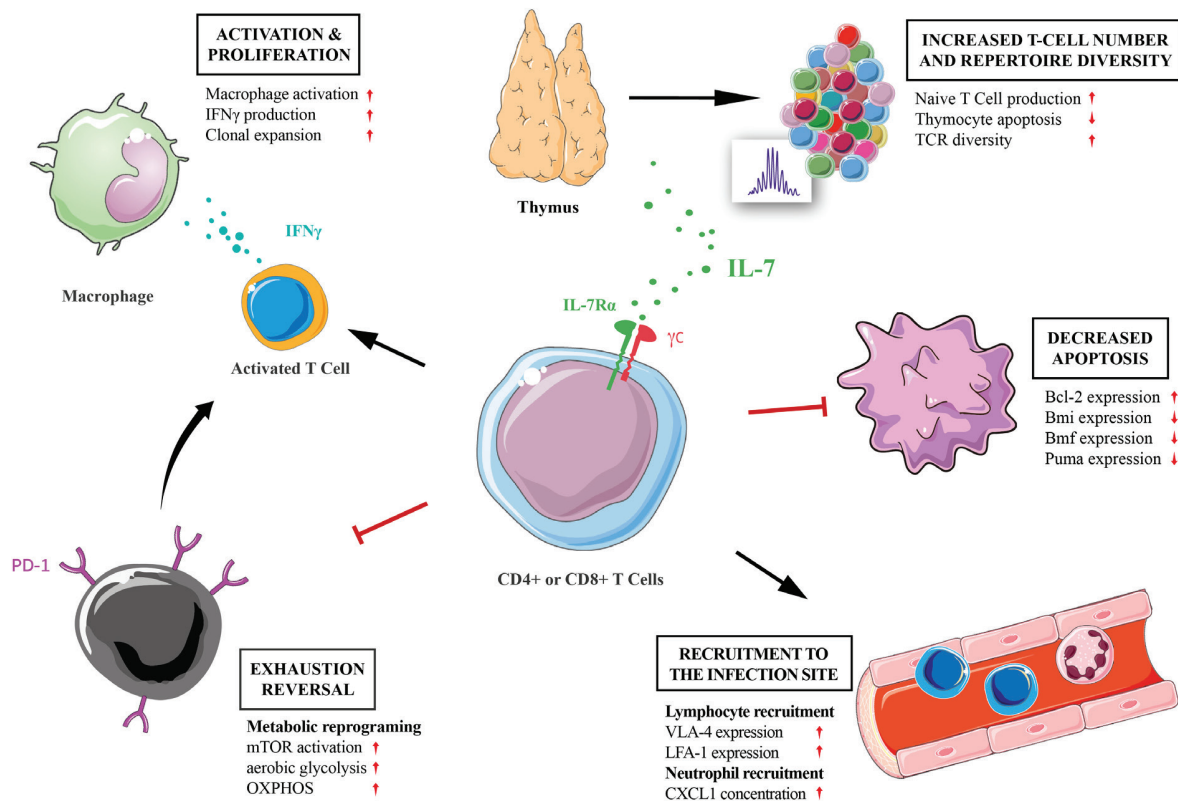


FIG. 1: Recombinant human interleukin-7 (rhIL-7) has multiple immunomodulatory effects to counteract sepsis-induced immune alterations. It decreases septic-induced lymphocyte apoptosis via modulation of apoptotic gene expression. It improves lymphocyte trafficking via expression of integrins and promotes neutrophil recruitment through an indirect induction and CXCL1 secretion. rhIL-7 reverses immunometabolic failure of exhausted lymphocytes by acting on the mTOR pathway. It can also induce CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation and proliferation, thus increasing IFN γ production leading to macrophage activation. Finally, rhIL-7 increases naïve T cell production from the thymus, prevents sepsis-induced thymic atrophy, and increases TCR repertoire diversity. Abbreviations: IL-7, interleukin-7; TCR, T cell receptor; LFA-1, lymphocyte function associated antigen 1; VLA-4, very late antigen 4; PD-1, programmed cell death receptor 1; IFN γ , interferon- γ ; Bcl-2, B cell lymphoma 2; OXPHOS, oxidative phosphorylation.

induced expression of trafficking molecules at T cell surfaces such as LFA-1 and VLA-4.^{99,102} In a two-hit model of sublethal CLP followed by *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, IL-7 administration not only increased lymphocyte numbers and cytokine production but also improved immune cell recruitment to the infection site, via action on $\gamma\delta$ T cells and CXCL1 secretion.¹⁰²

2. Human ex Vivo Studies

Several *ex vivo* studies reproduced in patients' cells the beneficial effects of rhIL-7 on sepsis-induced

lymphocyte alterations. For example, rhIL-7 administration restored lymphocyte proliferation, IFN γ production, STAT5 phosphorylation, and Bcl2 expression upon incubation with septic patients' mononuclear cells.⁶⁷ rhIL-7 also improved *ex vivo* metabolic reprogramming of exhausted CD4⁺ T lymphocytes after sepsis via its action on the mTOR pathway.⁶⁸ Moreover, unlike IL-2, it seems to have relatively few effects on Tregs,^{103,104} which are involved in the generation of long-lasting immune dysfunctions following sepsis.²⁸

In an *ex vivo* model of mononuclear cells purified from patients infected with different endemic

pathogens, such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, and cytomegalovirus (CMV), rhIL-7 incubation favored the expansion of pathogen-specific CD4⁺ T cells by promoting pathogen-specific interferon- γ , IL-2, and TNF recall responses.¹⁰⁵ This suggests that rhIL-7 might be able to promote the clearance of such persistent or poorly immunogenic pathogens. Recently, Thampy et al. evaluated *ex vivo* rhIL-7 efficacy to restore T cell function in multidrug resistant (MDR) bacteria-infected patients.¹⁰⁶ These patients were more lymphopenic and had increased lymphocyte exhaustion markers expression compared with critically ill nonseptic patients. rhIL-7, anti-PD-L1 antibodies, and OX40L treatments *ex vivo* were all effective in increasing IFN γ production by T cells. Among these three treatments, rhIL-7 was the most effective.

B. Clinical Trials

The most promising results regarding the use of rhIL-7 in sepsis came from the recently published human phase II clinical trial by François et al.¹⁰⁷ In this study, 27 patients with vasopressor-dependent septic shock and severe lymphopenia (defined as lymphocyte count < 900 μ L) were randomized to receive either CYT107, a glycosylated rhIL-7, or its placebo. CYT107 increased lymphocyte counts 3.5- to 4.5-fold by day 28. This effect was evidenced on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells with the same proportions and persisted for at least two to four weeks following cessation of therapy. This was consistent with previous reports demonstrating the long-lasting effect of CYT107 on lymphocyte count: one year after discontinuation of therapy.⁸⁴ This is in favor of the ability of rhIL-7 to reverse long-lasting immune dysfunctions after sepsis and advocates for a long-term follow-up of patients after rhIL-7 therapy. Treatment with rhIL-7 induced strong lymphocyte cell cycling after sepsis as measured by expression of Ki67. Indeed, the percentage of Ki67⁺ CD4⁺ T cells increased from 10% pre-CYT107 treatment to approximately 50% after treatment. CYT107 also increased activation marker expressions on CD4⁺ T cells (CD38 and HLA-DR) without increasing the expression of exhaustion markers (PD-1). Noteworthy is that this therapy had very few effects on innate immune cell numbers (neutrophils and monocytes) or

B cell numbers, illustrating its rather specific impact on T cell compartments. This study did not assess a beneficial effect of rhIL-7 treatment on mortality and secondary infection occurrence. Overall mortality was low, and no difference between groups was observed. However, CYT107-treated patients tended to develop fewer secondary infections.

VII. SAFETY OF rhIL-7 THERAPY

The major concern with immunotherapies is their possibly devastating side effects. This is highlighted by the recent literature on side effects induced after CAR T cell treatments in oncology.¹⁰⁸ Such incidence might be equivalent to cytokine therapy.

No major life-threatening adverse effect has been recorded following the use of rhIL-7 therapy. In the published clinical trials assessing the efficacy of rhIL-7 in different clinical conditions (HIV infection, cancer, HSCT, etc.), the incidence of adverse events of grade 2 or higher varied from 8% to 66% with a dose-limiting effect (Table 2). Indeed, adverse events were reported for high-dose regimens or high-frequency administration. The most common feature is a cutaneous rash at the injection site. For example, in the last study by François et al., the only reported adverse effect was a skin reaction of grade 2–3 at the injection site. Such reaction motivated discontinuation of treatment in four patients because of progression of symptoms. All patients with this adverse effect, including those four, fully recovered without sequel after completion of rhIL-7 treatment.

Another safety concern regarding rhIL-7 therapy is its putative immunogenic property related to the production process. Indeed, the original material produced in *Escherichia coli*-induced neutralizing anti-IL-7 antibodies in treated patients, which prevented further reinjections.¹⁰⁹ Such neutralizing antibodies could affect endogenous IL-7 secretion and worsen lymphopenia with catastrophic consequences. A similar scenario was documented after recombinant erythropoietin administration.¹¹⁰ Apparently, the recently developed Chinese hamster ovary (CHO)-derived mammalian cytokine overcomes this immunogenicity and offers a much better tolerance profile, as no recent study described neutralizing antibody appearance following rhIL-7 injection (Table 2).

TABLE 2: Published clinical trials on the use of rhIL-7 in patients and rhIL-7 safety profile

Study Title	Patient Population	Number of Patients	Drug	Adverse Effect Grade ≥ 2	Type and Severity	Immuno-genic Testing	Year	Reference
IL-7 Administration to Humans Leads to Expansion of CD8+ and CD4+ Cells but a Relative Decrease of CD4+ T-Regulatory Cells	Metastatic melanoma/sarcoma	12	CYT99-007	25% (3/12—30 and 60 $\mu\text{g/kg}$)	1 grade 3 hypocalcemia (apheresis related?); 2 grade 3 hepatitis	12/12 low-titer Ab	2006	76
Enhanced T Cell Recovery in HIV-1-Infected Adults through IL-7 treatment	HIV infection	14	CYT99-007	17% (1/14—10 $\mu\text{g/kg}$)	IRRs; 1 grade 3 hepatitis	No neutralizing Ab	2009	83
IL-7 Administration Drives T Cell–Cycle Entry and Expansion in HIV-1 Infection	HIV infection	25	CYT99-007	12.5% (2/25—30 $\mu\text{g/kg}$)	Grade 3 skin induration at site; 1 grade 3 hepatitis	No neutralizing Ab	2009	85
Phase I Study of rh-IL7 Administration in Subjects with Refractory Malignancy	Refractory malignancy	16	CYT99-007	56% (9/16)	1 grade 3 hepatitis (60 $\mu\text{g/kg}$); 1 grade 3 chest pain with elevated cardiac enzymes	8/16, nonneutralizing Ab	2010	96
rh-IL7 (CYT107) Promotes T-Cell Recovery after Allogeneic Stem Cell Transplantation	Allogeneic stem cell transplant	12	CYT107	33% (4/12)	3 grade 2 skin rash; 1 grade 3 GvHD	No neutralizing Ab	2012	72
Effects of rhIL-7 on T-Cell Recovery and Thymic Output in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy: Results of a Phase I/IIa Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Study	HIV infection	26	CYT107	8% (2/26—30 $\mu\text{g/kg}$)	1 grade 3 hepatitis; 1 grade 2 IRR	No neutralizing Ab	2012	84
ELYPSE-7: A Randomized Placebo-Controlled Phase IIa Trial with CYT107 Exploring the Restoration of CD4+ Lymphocyte Count in Lymphopenic Metastatic Breast Cancer Patients	Breast cancer	20	CYT107	8% (1/12)	1 fatal adverse reaction (respiratory failure) of uncertain relationship	N/A	2015	73

TABLE 2: (continued)

Study Title	Patient Population	Number of Patients	Drug	Adverse Effect Grade ≥ 2	Type and Severity	Immuno-genic Testing	Year	Reference
Interleukin-7: A Promising Treatment of PML for Some Types of Lymphopenia. Case Report and Literature Review	JC virus infection	7	Various	No serious adverse event recorded	—	N/A	2016	80
Treatment Intensification Followed by Interleukin-7 Reactivates HIV without Reducing Total HIV DNA: A Randomized Trial	HIV infection	29	CYT107	65% (19/27)	1 phlebitis related to study treatment	N/A	2016	88
Administration of Interleukin-7 Increases CD4 T Cells in Idiopathic CD4 lymphocytopenia	Idiopathic CD4 lymphocytopenia	9	CYT107	66% (6/9—10 $\mu\text{g/kg}$)	Grade 2 IRR (2 pts); grade 2 diarrhea (4 pts)	1 pt nonneutralizing Ab	2016	78
Repeated Cycles of rhIL-7 in HIV-Infected Patients with Low CD4 T-Cell Reconstitution on Antiretroviral Therapy: Results of 2 Phase II Multicenter Studies	HIV infection	107	CYT107	22%	Grade 3 IRR (2 pts); allergic reaction: grade 2 (1 pt), grade 3 (4 pts)	N/A	2016	86
Interleukin-7 Restores Lymphocytes in Septic Shock: The IRIS-7 Randomized Clinical Trial	Septic shock	27	CYT107	22% (6/27)	6 grade 2–3 rash; no hepatitis or kidney injury reported	No neutralizing Ab	2018	107

Ab, antibody; GvHD, graft versus host disease; HIV, human immunodeficiency virus; IRR, injection-related reaction; rhIL-7: recombinant human interleukin 7; CYT107, *E. Coli*-derived material; CYT99-007, CHO-derived material.

The final concern with rhIL-7 administration is its potential stimulating effect on autoreactive T cells. Indeed, dysregulated IL-7 response has been described in several autoimmune pathologies such as rheumatoid arthritis, colitis, and multiple sclerosis among others.⁴⁸ This is consistent with the IL-7 stimulatory effect on immune responses to low-affinity and self-antigens.¹¹¹ No such adverse effect has been recorded, but further trials with close surveillance over time are needed to assess the complete safety of this recombinant cytokine (Table 2).

VIII. rhIL-7 USE IN SEPSIS

A. Combination Therapy

In oncology, recombinant cytokine treatment is emerging as part of a combination therapeutic strategy. As immune checkpoint inhibitors have recently revolutionized cancer treatment and prognosis, response to these therapies remains heterogeneous and many patients do not respond.¹¹² By combining immunotherapies, clinicians hope to enhance and broaden their efficacy.

Recently, Zacharakis et al. reported the case of a patient suffering from multimetastatic breast cancer successfully treated with adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes reactive against cancer-related proteins as well as rhIL-2 and immune checkpoint inhibitors.⁹⁰ Through this approach, they broadened the diversity of tumor neoantigens that could be recognized by patient's lymphocytes and boosted immune cells with cytokine therapy. This therapeutic strategy led to a complete and durable cancer regression in this patient.

Similarly, IL-7 increases the number of circulating lymphocytes, their repertoire diversity, and their migration to the tumor site. In an *ex vivo* experiment, IL-7 demonstrated synergistic effects with IL-21 in the increasing expansion of antitumor T cells.¹¹³ In combination with IFN γ , IL-7 also increased survival in a rat glioma model.¹¹⁴ Although its effect in combination with anti-PD-1 treatment has not been assessed in patients, preliminary data indicate a possible complementary effect.^{115,116}

In infectious diseases, we may similarly anticipate that not all patients will respond to immunotherapy in the same way. Thus, combination therapy might become part of the next therapeutic arsenal. In this context, *yc* cytokines are of particular interest as they decrease the immunogenic threshold of antigens and may therefore potentiate immune checkpoint blockage or CAR T cell therapy.¹⁰⁹ For example, in a two-hit model of sepsis in mice, Shindo et al. demonstrated differential effects of IL-7 and anti-PD-1 therapy. While IL-7 showed a strong effect on increasing lymphocyte counts, cytokine production, and adhesion molecules; anti-PD-1 treatment appeared to have more of an effect on the innate immune system, increasing MHC II expression on macrophages and dendritic cells.⁹⁹ Recently, Grimaldi et al. reported the case of a woman admitted after multiple trauma who latterly suffered from a dramatic form of invasive mucormycosis.³⁸ After failure of combined antifungal treatment and surgical intervention, her case appeared desperate and the patient would die if no intervention were to be undertaken. As biological examination showed hallmarks of severe immune suppression (increased PD-1 expression on T cells and low mHLA-DR), immunoadjuvant therapy combining

IFN γ and nivolumab was initiated. Immunological examinations showed mHLA-DR upregulation, increased lymphocyte count, and decreased lymphocyte PD-1 expression upon treatment initiation. The patient slowly improved and was discharged after two months. Such findings and the possibility of combining treatments with different targets in this immune system represents a strong rationale for combination therapy in sepsis.

B. Biomarkers

Considering the high variability in clinical response to immunotherapy and the heterogeneity of the septic shock population, in particular regarding rapidly evolving immune status, it appears crucial to stratify patients who will benefit from immune intervention in a personalized medicine approach. In sepsis, this need for patient stratification was recently highlighted by a reanalysis of trials of drugs inhibiting IL-1 activity which initially failed to show any benefit. This reanalysis showed that patients with the biological criterion of macrophage activation syndrome (hyperferritinemia and cytopenia) showed significant improvement in 28-day survival in response to treatment.^{117,118}

Among biomarkers of sepsis-induced immune dysfunction, decreased monocytic HLA-DR expression (mHLA-DR) is the most common and is also well-documented.^{119,120} Its downregulation after sepsis has been associated with increased mortality and susceptibility to secondary infections in various clinical conditions, including septic shock.¹²¹ However, the correlation between mHLA-DR expression, a marker of monocyte functionality, and lymphocyte immune dysfunction has yet to be described. Thus, its relevance in the stratification of a treatment targeting T cells is not obvious. The ongoing observational trial REALISM might provide some answers on this topic.¹²²

Regarding biomarkers specific to lymphocyte dysfunctions, lymphocyte count appears to be a good candidate. Lymphopenia is strongly associated with a poor outcome in septic shock patients.¹²³ A lymphocyte count < 900 μ L was chosen in the recent IRIS-7 trial as a stratification criterion. In addition, circulating lymphocyte count is easily

accessible even in hospitals where flow cytometry is not routinely available. However, a simple lymphocyte count does not foreshadow the functionality of remaining lymphocytes or their regenerative capacity, highlighting the need for more specific tests.

PD-1 expression on CD4⁺ lymphocytes has been associated with decreased lymphocyte proliferation, increased mortality, and nosocomial infection following sepsis. This molecule may thus be a suitable candidate to assess lymphocyte exhaustion in sepsis and so to identify patients suitable for lymphocyte-targeting immunotherapy.⁴⁶ In addition, it should be noted that rhIL-7 administration may positively influence PD-1 expression on lymphocytes, suggesting that this molecule may also help in monitoring response to rhIL-7 treatment.¹¹⁶ However, the performance of PD-1/PD-L1 expression in predicting response to immune therapy is debated,¹²⁴ and the use of PD-1 expression as a companion marker for immunotherapy in sepsis remains to be evaluated.^{124,125}

Finally, CD127 expression can be used a stratification marker for rhIL-7 therapy. In a recent study, Delwarde et al. demonstrated that low CD127 mRNA expression is strongly associated with mortality following septic shock.¹²⁶ They also found increased concentration of sCD127 to be associated with poor outcome in ICU patients.⁷⁰ Finally, François et al. showed that CD127 expression is downregulated following administration of rhIL-7 in patients, and those with decreased CD127 expression following treatment did not benefit from new administration.¹⁰⁷ Thus, CD127 expression might be a promising candidate to (1) identify patients suitable for rhIL-7 therapy, (2) assess response to rhIL-7 treatment measured by downregulation of its receptor, and (3) drive rhIL-7 administration by setting the pace of injections and limiting numerous, potentially harmful, injections.

C. Bioengineering and New Molecules

Improvement in rhIL-7 pharmacology through bioengineering is ongoing, and more efficient molecules may soon be released. Recently, Genexine announced the start of a phase Ib/IIa clinical trial evaluating an optimized interleukin-7 treatment

with hyFc technology.¹²⁷ This novel molecule is constituted by two engineered homodimeric IL-7 molecules, biologically fused with the long-acting carrier platform hyFc, which is derived from human IgD and IgG1. This leads to increased half-life (due to binding to FcRn) of the recombinant molecule and prevention of targeted cell death via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or complement-dependent cytotoxicity (CDC) reaction (IgG4 and IgD properties).

In a recent study, Sockolosky et al. used an engineered IL-2-IL-2R pair, referred to as an orthogonal pair, to expand effector T cells in cancer while avoiding the toxicities associated with administration of recombinant IL-2. Using this bioengineered treatment, they could overcome IL-2-induced expansion of Tregs and capillary leak syndrome.¹²⁸ These very promising results open the door to the generation of other orthogonal cytokine receptor pairs. For example, an IL-7-IL-7R orthogonal pair might be useful in circumventing the potential oncogenic signaling of this molecule.¹²⁹

IX. CONCLUSION

In 2018, sepsis remains a major health problem worldwide. Most septic patients develop a profound immunosuppression of their adaptive immune response, which is crucial to effective anti-infectious responses. Hence, immune stimulation appears to be a relevant therapeutic opportunity in patients with the most severe immune dysfunction. Among the available treatments, rhIL-7, with a strong efficacy demonstrated in multiple clinical trials and a good tolerance profile, appears to be a good candidate. A phase III clinical trial assessing its efficacy and tolerance is awaited. It is understood that immune stimulation must pair with tight surveillance of response to treatment and side effects. This long-term surveillance should focus not only on safety criteria but also on long-term clinical outcomes such as physical recovery, hospital stay, and delayed mortality.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank M. Morre for his helpful discussions and his insights into IL-7 therapeutic

applications. We would also like to thank F. Magni Milocco for her invaluable help in realizing Figure 1. FV and GM are co-inventors of three patent families covering IL-7 receptor biomarkers.

REFERENCES

- Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing sepsis as a global health priority—a WHO resolution. *N Engl J Med*. 2017;377:414–7.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348:1546–54.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:801–10.
- van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:407–20.
- MacLean LD, Meakins JL, Taguchi K, Duignan JP, Dhillon KS, Gordon J. Host resistance in sepsis and trauma. *Ann Surg*. 1975;182:207–17.
- Cohen J, Opal S, Calandra T. Sepsis studies need new direction. *Lancet Infect Dis*. 2012;12:503–5.
- Angus DC. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board?. *JAMA*. 2011;306:2614–5.
- Hotchkiss RS, Sherwood ER. Getting sepsis therapy right. *Science*. 2015;347:1201–2.
- Daviaud F, Grimaldi D, Dechartres A, Charpentier J, Geri G, Marin N, Chiche J-D, Cariou A, Mira J-P, Pène F. Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care*. 2015;5:16.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:862–74.
- Meyer NJ, Reilly JP, Anderson BJ, Palakshappa JA, Jones TK, Dunn TG, Shashaty MGS, Feng R, Christie JD, Opal SM. Mortality benefit of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist for sepsis varies by initial interleukin-1 receptor antagonist plasma concentration. *Crit Care Med*. 2018;46:21.
- Textoris J, Mallet F. Immunosuppression and herpes viral reactivation in intensive care unit patients: one size does not fit all. *Crit Care*. 2017;21:230.
- Huber-Lang M, Lambris JD, Ward PA. Innate immune responses to trauma. *Nat Immunol*. 2018;19:327–41.
- Stiel L, Meziani F, Helms J. Neutrophil activation during septic shock. *Shock (Augusta GA)*. 2018;49:371–84.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1999;27:1230–51.
- Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis M-A, Darbon R, Allombert C, Mougin B, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Monneret G. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock*. 2010;34:358.
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:813–22.
- Monneret G, Debard A-L, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, Lepape A. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med*. 2003;31:2068.
- Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Cooper-Smith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol*. 2005;174:5110–5118.
- Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock (Augusta GA)*. 2014;42:383–91.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997;390:350–1.
- Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJD, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998;188:2205–13.
- Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:486–99.
- Venet F, Pachot A, Debard A-L, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Powell WS, Monneret G. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol*. 2006;177:6540–7.
- Venet F, Chung C-S, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohé J, Lepape A, Ayala A, Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009;35:678–86.
- Cavassani KA, Carson WF, Moreira AP, Wen H, Schaller MA, Ishii M, Lindell DM, Dou Y, Lukacs NW, Keshamouni VG, Hogaboam CM, Kunkel SL. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood*. 2010;115:4403–11.
- Nascimento DC, Alves-Filho JC, Sônego F, Fukada SY, Pereira MS, Benjamim C, Zamboni DS, Silva JS, Cunha FQ. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2010;38:1718–25.
- Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, Ferreira RG, Colón DF, Donat PB, Castanheira FV, Gozzi A, Czaikoski PG, Niedbala W, Borges MC, Zamboni DS, Liew FY, Cunha FQ, Alves-Filho JC. IL-33 contributes to sepsis-induced

- long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nat Commun.* 2017;8:14919.
29. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2006;2:e62.
 30. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol.* 1994;152:5014–21.
 31. Gruver AL, Ventevogel MS, Sempowski GD. Leptin receptor is expressed in thymus medulla and leptin protects against thymic remodeling during endotoxemia-induced thymus involution. *J Endocrinol.* 2009;203:75–85.
 32. Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A, Malcus C, Poitevin-Later F, Grives A, Plantier N, Pasqual N, Monneret G. Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study*. *Crit Care Med.* 2013;41:111.
 33. Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, Parizot C, Li T, Katlama C, Karmochkine M, Raguin G, Autran B, Debré P. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med.* 1998;4:215–21.
 34. Miqueu P, Degauque N, Guillet M, Giral M, Ruiz C, Pallier A, Braudeau C, Roussey-Kesler G, Ashton-Chess J, Doré J-C, Thervet E, Legendre C, Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Goldman M, Volk H-D, Janssen U, Wood KJ, Lechler RI, Bertrand D, Sébille V, Souillou J-P, Brouard S. Analysis of the peripheral T-cell repertoire in kidney transplant patients. *Eur J Immunol.* 2010;40:3280–90.
 35. Döcke W-D, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk H-D, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: Restoration by IFN- γ treatment. *Nat Med.* 1997;3:678–81.
 36. Armstrong-James D, Teo IA, Shrivastava S, Petrou MA, Taube D, Dorling A, Shaunak S. Exogenous interferon- γ immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients. *Am J Transplant.* 2010;10:1796–803.
 37. Delsing CE, Gresnigt MS, Leentjens J, Preijers F, Frager FA, Kox M, Monneret G, Venet F, Bleeker-Rovers CP, van de Veerdonk FL, Pickkers P, Pachot A, Kullberg BJ, Netea MG. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect Dis.* 2014;14:166.
 38. Grimaldi D, Pradier O, Hotchkiss RS, Vincent J-L. Nivolumab plus interferon- γ in the treatment of intractable mucormycosis. *Lancet Infect Dis.* 2017;17:18.
 39. Kullberg B-J, van de Veerdonk F, Netea MG. Immunotherapy: a potential adjunctive treatment for fungal infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27:511.
 40. Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Barrios-Payan J, Hernandez-Pando R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med Oncol.* 2014;31:774.
 41. Bo L, Wang F, Zhu J, Li J, Deng X. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit Care Lond Engl.* 2011;15:R58.
 42. Nelson LA. Use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse anergy in otherwise immunologically healthy children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007;98:373–82.
 43. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk H-D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:640–8.
 44. Dignani MC, Rex JH, Chan K-W, Dow G, deMagalhaes-Silverman M, Maddox A, Walsh T, Anaissie E. Immunomodulation with interferon-gamma and colony-stimulating factors for refractory fungal infections in patients with leukemia. *Cancer.* 2005;104:199–204.
 45. Shao R, Fang Y, Yu H, Zhao L, Jiang Z, Li C-S. Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3–4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Crit Care.* 2016;20:124.
 46. Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, Malcus C, Chéron A, Allaouchiche B, Gueyffier F, Ayala A, Monneret G, Venet F. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care.* 2011;15:R99.
 47. Hotchkiss R, Colston E, Yende S, Angus D, Moldawer L, Crouser E, Martin G, Coopersmith C, Brakenridge S, Mayr F, Park P, Zhu K, Wind-Rotolo M, Duan T, Ye J, Luo Y, Catlett I, Rana K, Grasela D. 1504: Immune checkpoint inhibitors in sepsis: a phase Ib trial of anti-PD-L1 (BMS-936559). *Crit Care Med.* 2018;46:736.
 48. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:330–42.
 49. ElKassar N, Gress RE. An overview of IL-7 biology and its use in immunotherapy. *J Immunotoxicol.* 2010;7:1–7.
 50. Pellegrini M, Calzascia T, Elford AR, Shahinian A, Lin AE, Dissanayake D, Dhanji S, Nguyen LT, Gronski MA, Morre M, Assouline B, Lahl K, Sparwasser T, Ohashi PS, Mak TW. Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies. *Nat Med.* 2009;15:528–36.
 51. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet.* 1998;20:394–7.
 52. Maki K, Sunaga S, Komagata Y, Kodaira Y, Mabuchi A, Karasuyama H, Yokomuro K, Miyazaki JI, Ikuta K. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:7172–7.
 53. Boesteanu A, Silva ADD, Nakajima H, Leonard WJ, Peschon JJ, Joyce S. Distinct roles for signals relayed through the common cytokine receptor γ chain and interleukin 7 receptor α chain in natural T cell development. *J Exp Med.* 1997;186:331–6.

54. Sprent J, Surh CD. Interleukin 7, maestro of the immune system. *Semin Immunol.* 2012;24:149–50.
55. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by γ_c family cytokines. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:480–90.
56. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006;203:1701–11.
57. Alves NL, van Leeuwen EMM, Derks IAM, van Lier RAW. Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling. *J Immunol.* 2008;180:5201–10.
58. Crawley AM, Faucher S, Angel JB. Soluble IL-7R α (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. *J Immunol.* 2010;184:4679–87.
59. Lundström W, Highfill S, Walsh STR, Beq S, Morse E, Kockum I, Alfredsson L, Olsson T, Hillert J, Mackall CL. Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:E1761–70.
60. Park J-H, Yu Q, Erman B, Appelbaum JS, Montoya-Durango D, Grimes HL, Singer A. Suppression of IL7R α transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent t cell survival. *Immunity.* 2004;21:289–302.
61. Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:783–8.
62. Fry TJ. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood.* 2001;97:2983–90.
63. Rocha B, Dautigny N, Pereira P. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur J Immunol.* 1989;19:905–11.
64. Terashima A, Okamoto K, Nakashima T, Akira S, Ikuta K, Takayanagi H. Sepsis-induced osteoblast ablation causes immunodeficiency. *Immunity.* 2016;44:1434–43.
65. Andreu-Ballester JC, Cuellar C, Garcia-Ballesteros C, Pérez-Griera J, Amigó V, Peiró-Gómez A, Peñarroja-Otero C, Ballester F, Mayans J, Tormo-Calandín C. Deficit of interleukin 7 in septic patients. *Int Immunopharmacol.* 2014;23:73–6.
66. White M, Mahon V, Greal R, Doherty DG, Stordeur P, Kelleher DP, McManus R, Ryan T. Post-operative infection and sepsis in humans is associated with deficient gene expression of γ_c cytokines and their apoptosis mediators. *Crit Care.* 2011;15:R158.
67. Venet F, Foray A-P, Villars-Méchin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Monneret G. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol.* 2012;189:5073–81.
68. Venet F, Demaret J, Blaise BJ, Rouget C, Girardot T, Idealisoa E, Rimmelé T, Mallet F, Lepape A, Textoris J, Monneret G. IL-7 restores T Lymphocyte immunometabolic failure in septic shock patients through mTOR activation. *J Immunol.* 2017;199:1606–15.
69. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care.* 2012;16:R112.
70. Peronnet E, Mouillaux J, Monneret G, Gallet-Gorius E, Blein-Henry S, Lepape A, Textoris J, Venet F; MRS Group. Elevated soluble IL-7 receptor concentration in non-survivor ICU patients. *Intensive Care Med.* 2016;42:1639–40.
71. Morrissey PJ, Conlon P, Braddy S, Williams DE, Namen AE, Mochizuki DY. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol.* 1991;146:1547–52.
72. Perales M-A, Goldberg JD, Yuan J, Koehne G, Lechner L, Papadopoulos EB, Young JW, Jakubowski AA, Zaidi B, Gallardo H, Liu C, Rasalan T, Wolchok JD, Croughs T, Morre M, Devlin SM, van den Brink MRM. Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2012;120:4882–91.
73. Trédan O, Ménétrier-Caux C, Ray-Coquard I, Garin G, Cropet C, Verronèse E, Bachelot T, Rebattu P, Heudel PE, Cassier P, Chabaud S, Croughs T, Dupont P, Cadore AC, Clapisson G, Delgado A, Bardin-dit-Courageot C, Rigal C, N'Kodia A, Gilles-Afchain L, Morre M, Pérol D, Blay JY, Caux C. ELYPSE-7: a randomized placebo-controlled phase IIa trial with CYT107 exploring the restoration of CD4+ lymphocyte count in lymphopenic metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2015;26:1353–62.
74. Alpdogan Ö, Muriglan SJ, Eng JM, Willis LM, Greenberg AS, Kappel BJ, van den Brink MRM. IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest.* 2003;112:1095–07.
75. Alpdogan O, Schmaltz C, Muriglan SJ, Kappel BJ, Perales M-A, Rotolo JA, Halm JA, Rich BE, van den Brink MRM. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood.* 2001;98:2256–65.
76. Toubert A. IL-7 earns her ticket in allo-HSCT. *Blood.* 2012;120:4669–770.
77. Rosenberg SA, Sportès C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, Stetler-Stevenson M, Morton KE, Mavroukakis SA, Morre M, Buffet R, Mackall CL, Gress RE. IL-7 administration to humans leads to expansion of Cd8+ and Cd4+ cells but a relative decrease of Cd4+ T-regulatory cells. *J Immunother.* 2006;29:313–9.
78. Sheikh V, Porter BO, DerSimonian R, Kovacs SB, Thompson WL, Perez-Diez A, Freeman AF, Roby G, Mican J, Pau A, Rupert A, Adelsberger J, Higgins J, Bourgeois JS, Jensen SMR, Morcock DR, Burbelo PD, Osnos L, Maric I, Natarajan V, Croughs T, Yao MD, Estes JD, Sereti I. Administration of interleukin-7 increases CD4 T cells in idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Blood.* 2016;127:977–88.

79. Alstadhaug KB, Croughs T, Henriksen S, Leboeuf C, Sereti I, Hirsch HH, Rinaldo CH. Treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy with interleukin 7. *JAMA Neurol.* 2014;71:1030–1035.
80. Gorza L, Bourdain F, Gagnault J, Lapergue B. Interleukine-7 : une thérapeutique prometteuse de la LEMP dans certaines lymphopénies. Rapport de cas et revue de la littérature. *Prat Neurol-FMC.* 2016;7:276–82.
81. Soleimani-Meigooni DN, Schwetke KE, Angeles MR, Ryschewitsch CF, Major EO, Dang X, Koralnik IJ, Schmidt RE, Clifford DB, Kuhlmann FM, Bucelli RC. JC virus granule cell neuronopathy in the setting of chronic lymphopenia treated with recombinant interleukin-7. *J Neurovirol.* 2017;23:141–6.
82. Sospedra M, Schippling S, Yousef S, Jelcic I, Bofill-Mas S, Planas R, Stellmann J-P, Demina V, Cinque P, Garcea R, Croughs T, Girones R, Martin R. Treating progressive multifocal leukoencephalopathy with interleukin 7 and vaccination with JC virus capsid protein VP1. *Clin Infect Dis.* 2014;59:1588–92.
83. Levy Y, Lacabartz C, Weiss L, Viard J-P, Goujard C, Lelièvre J-D, Boué F, Molina J-M, Rouzioux C, Avettand-Fénoël V, Croughs T, Beq S, Thiébaud R, Chêne G, Morre M, Delfraissy J-F. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest.* 2009;119:997–1007.
84. Lévy Y, Sereti I, Tambussi G, Routy JP, Lelièvre JD, Delfraissy JF, Molina JM, Fischl M, Goujard C, Rodriguez B, Rouzioux C, Avettand-Fénoël V, Croughs T, Beq S, Morre M, Poulin JF, Sekaly RP, Thiebaut R, Lederman MM. Effects of recombinant human interleukin 7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study. *Clin Infect Dis.* 2012;55:291–300.
85. Sereti I, Dunham RM, Spritzler J, Aga E, Proschan MA, Medvik K, Battaglia CA, Landay AL, Pahwa S, Fischl MA, Asmuth DM, Tenorio AR, Altman JD, Fox L, Moir S, Malaspina A, Morre M, Buffet R, Silvestri G, Lederman MM; ACTG 5214 Study Team. IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood.* 2009;113:6304–14.
86. Thiébaud R, Jarne A, Routy J-P, Sereti I, Fischl M, Ives P, Speck RF, D'Offizi G, Casari S, Commenges D, Foulkes S, Natarajan V, Croughs T, Delfraissy J-F, Tambussi G, Levy Y, Lederman MM. Repeated cycles of recombinant human interleukin 7 in HIV-infected patients with low CD4 T-cell reconstitution on antiretroviral therapy: results of 2 Phase II multicenter studies. *Clin Infect Dis.* 2016;62:1178–85.
87. Vandergeeten C, Fromentin R, DaFonseca S, Lawani MB, Sereti I, Lederman MM, Ramgopal M, Routy J-P, Sékaly R-P, Chomont N. Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood.* 2013;121:4321–9.
88. Katlama C, Lambert-Niclot S, Assoumou L, Papagno L, Lecardonnel F, Zoorob R, Tambussi G, Clotet B, Youle M, Achenbach CJ, Murphy RL, Calvez V, Costagliola D, Autran B; Team on behalf of the E-01 study. Treatment intensification followed by interleukin-7 reactivates HIV without reducing total HIV DNA: a randomized trial. *AIDS.* 2016;30:221.
89. Melchionda F, Fry TJ, Milliron MJ, McKirdy MA, Tagaya Y, Mackall CL. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J Clin Invest.* 2005;115:1177–87.
90. Zacharakis N, Chinnasamy H, Black M, Xu H, Lu Y-C, Zheng Z, Pasetto A, Langan M, Shelton T, Prickett T, Gartner J, Jia L, Trebska-McGowan K, Somerville RP, Robbins PF, Rosenberg SA, Goff SL, Feldman SA. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med.* 2018;24:724–30.
91. Colombetti S, Lévy F, Chapatte L. IL-7 adjuvant treatment enhances long-term tumor-antigen-specific CD8+ T-cell responses after immunization with recombinant lentivector. *Blood.* 2009;113:6629–37.
92. Andrew D, Aspinall R. IL-7 and not stem cell factor reverses both the increase in apoptosis and the decline in thymopoiesis seen in aged mice. *J Immunol.* 2001;166:1524–30.
93. van Lent AU, Dontje W, Nagasawa M, Siamari R, Bakker AQ, Pouw SM, Maijor KA, Weijer K, Cornelissen JJ, Blom B, Santo JPD, Spits H, Legrand N. IL-7 enhances thymic human T cell development in “human immune system” Rag2^{-/-}IL-2R^{γc}^{-/-} mice without affecting peripheral T cell homeostasis. *J Immunol.* 2009;183:7645–55.
94. Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood.* 2001;97:1491–7.
95. Okamoto Y, Douek DC, McFarland RD, Koup RA. Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function. *Blood.* 2002;99:2851–8.
96. Sportès C, Babb RR, Krumlauf MC, Hakim FT, Steinberg SM, Chow CK, Brown MR, Fleisher TA, Noel P, Maric I, Stetler-Stevenson M, Engel J, Buffet R, Morre M, Amato RJ, Pecora A, Mackall CL, Gress RE. Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010;16:727–35.
97. Nanjappa SG, Walent JH, Morre M, Suresh M. Effects of IL-7 on memory CD8+ T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *J Clin Invest.* 2008;118:1027–39.
98. Kang MC, Choi D-H, Choi YW, Park SJ, Namkoong H, Park KS, Ahn S-S, Surh CD, Yoon S-W, Kim D-J, Choi J, Park Y, Sung YC, Lee S-W. Intranasal introduction of Fc-fused interleukin-7 Provides long-lasting prophylaxis against lethal influenza virus infection. *J Virol.* 2015;90:2273–84.
99. Shindo Y, Unsinger J, Burnham C-A, Green JM, Hotchkiss RS. Interleukin-7 and anti-programmed cell death 1 antibody have differing effects to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Shock (Augusta GA).* 2015;43:334–3.

100. Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, McDonough JS, Tschoep J, Ferguson TA, McDunn JE, Morre M, Hildeman DA, Caldwell CC, Hotchkiss RS. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2010;184:3768–79.
101. Unsinger J, Burnham C-AD, McDonough J, Morre M, Prakash PS, Caldwell CC, Dunne WM, Hotchkiss RS. Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J Infect Dis.* 2012;206:606–16.
102. Shindo Y, Fuchs AG, Davis CG, Eitas T, Unsinger J, Burnham C-AD, Green JM, Morre M, Bochicchio GV, Hotchkiss RS. Interleukin 7 immunotherapy improves host immunity and survival in a two-hit model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Leukoc Biol.* 2017;101:543–54.
103. Demaret J, Dupont G, Venet F, Friggeri A, Lepape A, Rimmelé T, Morel J, Monneret G. STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study. *J Leukoc Biol.* 2015;97:791–6.
104. Dupont G, Demaret J, Venet F, Malergue F, Malcus C, Poitevin-Later F, Morel J, Monneret G. Comparative dose-responses of recombinant human IL-2 and IL-7 on STAT5 phosphorylation in CD4+FOXP3–cells versus regulatory T cells: a whole blood perspective. *Cytokine.* 2014;69:146–9.
105. Terrazzini N, Mantegani P, Kern F, Fortis C, Mondino A, Caserta S. Interleukin-7 unveils pathogen-specific T cells by enhancing antigen-recall responses. *J Infect Dis.* 2018;217:1997–2007.
106. Thampy LK, Remy KE, Walton AH, Hong Z, Liu K, Liu R, Yi V, Burnham C-AD, Hotchkiss RS. Restoration of T cell function in multi-drug resistant bacterial sepsis after interleukin-7, anti-PD-L1, and OX-40 administration. *PLoS One.* 2018;13:e0199497.
107. Francois B, Jeannot R, Daix T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, Monneret G, Rimmelé T, Blood T, Morre M, Gregoire A, Mayo GA, Blood J, Durum SK, Sherwood ER, Hotchkiss RS. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight.* 2018 Mar 8;3(5).
108. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther–Oncolytics.* 2016;3:16011.
109. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the treatment of cancer. *J Interferon Cytokine Res.* Epub ahead of print 11 June 2018. DOI: 10.1089/jir.2018.0019.
110. Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian J-J, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, Varet B, Mayeux P. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med.* 2002;14:469–75.
111. Goldrath AW, Bevan MJ. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity.* 1999;11:183–90.
112. Schmidt C. The benefits of immunotherapy combinations. *Nature.* Epub ahead of print 20 December 2017. DOI: 10.1038/d41586-017-08702-7.
113. Liu S, Lizée G, Lou Y, Liu C, Overwijk WW, Wang G, Hwu P. IL-21 synergizes with IL-7 to augment expansion and anti-tumor function of cytotoxic T cells. *Int Immunol.* 2007;19:1213–21.
114. Fritzell S, Eberstål S, Sandén E, Visse E, Darabi A, Siesjö P. IFN γ in combination with IL-7 enhances immunotherapy in two rat glioma models. *J Neuroimmunol.* 2013;258:91–5.
115. Pauken KE, Sammons MA, Odorizzi PM, Manne S, Godec J, Khan O, Drake AM, Chen Z, Sen DR, Kurachi M, Barnitz RA, Bartman C, Bengsch B, Huang AC, Schenkel JM, Vahedi G, Haining WN, Berger SL, Wherry EJ. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science.* 2016;354:1160–5.
116. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, Fauci AS. The common γ -chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol.* 2008;181:6738–6746.
117. Opal SM, Fisher CJ, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, Sadoff JC, Slotman GJ, Levy H, Balk RA, Shelly MP, Pribble JP, LaBrecque JF, Lookabaugh J, Donovan H, Dubin H, Baughman R, Norman J, DeMaria E, Matzel K, Abraham E, Seneff M. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med.* 1997;25:1115–24.
118. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, Amdur RL, Zhao H, Dinarello CA, Cron RQ, Opal SM. Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of the macrophage activation syndrome: re-analysis of a prior phase III trial. *Crit Care Med.* 2016;44:275–81.
119. Lukaszewicz A-C, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction*. *Crit Care Med.* 2009;37:2746–52.
120. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debarb A-L, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006;32:1175–83.
121. Monneret G, Lepape A, Venet F. A dynamic view of mHLA-DR expression in management of severe septic patients. *Crit Care.* 2011;15:1.
122. Rol M-L, Venet F, Rimmele T, Moucadel V, Cortez P, Quemeneur L, Gardiner D, Griffiths A, Pachot A, Textoris J,

- Monneret G; REALISM study group. 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.
123. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drénou B. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*. 2002;18:487–94.
124. Oncology TL. Immunotherapy: hype and hope. *Lancet Oncol*. 2018;19:845.
125. Khunger M, Hernandez AV, Pasupuleti V, Rakshit S, Pennell NA, Stevenson J, Mukhopadhyay S, Schalper K, Velcheti V. Programmed cell death 1 (PD-1) ligand (PD-L1) expression in solid tumors as a predictive biomarker of benefit from PD-1/PD-L1 axis inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *JCO Precis Oncol*. 2017;1–15.
126. Delwarde B, Peronnet E, Venet F, Rimmelé T, Monneret G, Textoris J. Low IL-7 receptor mRNA expression is independently associated with day 28 mortality in septic shock patient. *Crit Care Med*. 2018 Nov 1;46(11):1739–46.
127. NeoImmuneTech to conduct HyLeukin-7 and Tecentriq Phase Ib/IIa trial. *Drug Development Technology*. Available from: <https://www.drugdevelopment-technology.com/news/neo-immunetech-conduct-phase-ib-ii-a-trial-hyleukin-7-tecentriq/>.
128. Sockolosky JT, Trotta E, Parisi G, Picton L, Su LL, Le AC, Chhabra A, Silveria SL, George BM, King IC, Tiffany MR, Jude K, Sibener LV, Baker D, Shizuru JA, Ribas A, Bluestone JA, Garcia KC. Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes. *Science*. 2018;359:1037–42.
129. Mackall CL. Engineering a designer immunotherapy. *Science*. 2018;359:990–1.

ANNEXE 3



Brief communication

Sepsis is associated with lack of monocyte HLA-DR expression recovery without modulating T-cell reconstitution after lung transplantation



Julie Alingrin^{a,*,1}, Benjamin Coiffard^{b,*}, Julien Textoris^c, Corine Nicolino-Brunet^d, Morgane Gossez^e, Pierre-André Jarrot^d, Françoise Dignat-George^d, Guillaume Monneret^e, Pascal Alexandre Thomas^f, Marc Leone^a, Martine Reynaud-Gaubert^{g,2}, Laurent Papazian^{b,2}

^a Aix Marseille Université, APHM, Hôpital Nord, Service d'Anesthésie et de Réanimation, Marseille, France

^b APHM, CHU Hôpital Nord, Service de Médecine Intensive - Réanimation, Marseille, France

^c Service d'Anesthésie et de Réanimation, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

^d Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, C2VN, Marseille, France

^e Laboratoire d'Immunologie, EA7426 "Pathophysiology of Injury-Induced immunosuppression", Hospices Civils de Lyon – Université Claude Bernard Lyon bioMérieux, Lyon, France

^f APHM, CHU Hôpital Nord, Service de Chirurgie Thoracique, Marseille, France

^g APHM, CHU Hôpital Nord, Service de Pneumologie et de Transplantation Pulmonaire, Marseille, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Lung transplantation
Immunosuppression
Induction therapy
T-lymphocytes
Monocytes HLA-DR
Immune reconstitution
Sepsis

ABSTRACT

Background: Immunosuppressive strategy targets mainly adaptive immunity after solid organ transplantation. We assessed the influence of early post-operative sepsis on T cell and monocyte reconstitution in anti-thymocyte globulin (ATG)-treated lung transplant recipients.

Methods: We retrospectively included recipients who underwent a first lung transplant at our Lung Transplant Center (Marseille, France) between July 2011 and February 2013. Peripheral blood T-lymphocyte subset counts and monocyte HLA-DR (mHLA-DR) expression routinely performed by flow cytometry within 60 days post-transplant were analyzed. We compared the immune kinetics of patients who did or did not develop sepsis during the post-operative intensive care unit stay.

Results: Among the 37 recipients included, 19 patients (51%) developed at least one episode of sepsis. At the ICU admission, septic recipients had higher SOFA score (9 [7.5–9] versus 6 [4–7]), $p = .01$, higher primary graft dysfunction score (1.4 ± 1.4 versus 0.3 ± 0.7 , $p = .008$) and more frequent use of ECMO (47% versus 0%, $p = .003$). Whereas both groups had similar T-lymphocytes reconstitution in the post-operative period, mHLA-DR reconstitution was dramatically affected in septic patients after day 14, median mHLA-DR expression at 2.3 MFI [1.3–3.5] in the septic versus 8.0 MFI [5.1–10.5] in the non-septic group, $p = .02$.

Conclusion: We found that sepsis is negatively correlated with the mHLA-DR expression but not adaptive T cell immune reconstitution. This finding highlights the importance of immunomonitoring after lung transplantation and questions the strategy of a lower immunosuppression therapy in context of sepsis.

1. Introduction

Lung transplantation (Tx) has become a successful therapeutic

option for pulmonary end-stage diseases mainly represented by cystic fibrosis, emphysema and idiopathic pulmonary fibrosis. Long-term survival and recipient's life quality improve constantly, depending on

Abbreviations: Lung Tx, lung transplantation; HLA-DR, human leukocyte antigen-DR; ICU, Intensive care units; CMV, cytomegalovirus; ECMO, extra-corporeal membrane oxygenation; KDIGO, kidney disease: improving global outcomes; mHLA-DR, monocytes HLA-DR; MFI, mean of fluorescence intensity; IQR, interquartile range; SD, standard deviation; SOFA, sequential organ failure assessment; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ATG, anti-thymocyte globulins; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

* Corresponding author at: Service d'Anesthésie et de Réanimation, Hôpital Nord, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM), chemin des Bourrelly, Aix-Marseille University, 13915 Marseille cedex 20, France.

E-mail address: julie.alingrin@ap-hm.fr (J. Alingrin).

¹ First authors.

² Last authors.

<https://doi.org/10.1016/j.trim.2018.08.001>

Received 3 April 2018; Received in revised form 18 July 2018; Accepted 2 August 2018

Available online 03 August 2018

0966-3274/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

the etiology, careful selection of patients, improved surgical techniques of organ preservation and physiologic understanding of lung-transplantation [1,2].

Due to immunosuppressive regimen, postoperative management is complex, based on the prevention of acute rejection and management of opportunistic infections [3–5]. To date there are no clinical guidelines for immune monitoring. However, this could help physicians to better apprehend immune status and prevent opportunistic infectious risk after solid organ transplantation. In kidney transplantation, the relationships between immune phenotype, immunosuppression and infection have been explored and CD4+ T-cell count is a reliable predictor of opportunistic infections [6, 7]. In lung Tx, only few studies assessed immune monitoring [8]. An association between nadir CD4 T-cell count < 200 cells/ μ L and viral infections has been demonstrated [9]. Other lymphocyte populations are much less known and their potential diagnostic value is still to be evaluated. In pediatric lung Tx recipients, low expression levels of Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) on monocyte (mHLA-DR) have been associated with the development of sepsis [10].

It is now clearly admitted that sepsis deeply impairs immune homeostasis by inducing an anti-inflammatory process and compromise immune functions [11–13]. These alterations are responsible for worsening outcome, as they may play a major role in the decreased resistance to nosocomial infections in patients who survived initial infection, particularly in context of lung Tx. Immune dysfunctions have already been described in intensive care unit (ICU) septic patients and showed that some parameters (such as mHLA-DR expression or T-lymphocyte dysfunction) may serve as markers for prediction of adverse outcome or secondary nosocomial infections [14–16].

The aim of this study was to evaluate the influence of the sepsis, in the post-operative (po) period of lung Tx, on peripheral blood kinetics of mHLA-DR expression and T-lymphocyte reconstitution.

2. Methods

2.1. Study design and population

All patients who underwent lung Tx between July 2011 and February 2013 and who had an immune monitoring in our center were screened for inclusion in this single-center retrospective study (Lung Transplant Centre of Marseille, Aix-Marseille University, North Hospital, France). T-lymphocyte counts and mHLA-DR expression were measured within the first 60 post-transplant days. Immune parameters from septic and non-septic recipients were compared over time. Written informed consent was obtained from all patients prior to lung Tx with authorization to use all the medical data recorded through conventional lung Tx monitoring.

2.2. Patient management

The patient's trachea was intubated with a double lumen endotracheal tube. Central venous line, pulmonary arterial catheter and radial arterial line were placed after anesthesia induction. Antero-lateral bi-thoracotomies or Clamshell incisions with transverse sternotomies, for bilateral sequential lung transplantations, were performed. All lung transplants were admitted to the ICU at the end of the procedure. Immunosuppressive regimen (induction and maintenance therapy) is described in Fig. 1. The immunosuppressive protocol consisted in methylprednisolone, rabbit antithymocyte globulins (RATG) and ciclosporine or tacrolimus. It was adjusted individually, with immunosuppressive plasma level monitoring, and according to known toxic side effects. All patients received a prophylactic antibiotic treatment according to their colonization status. Seropositive CMV recipients received prophylactic IV ganciclovir or oral valganciclovir when available, for the first 2 postoperative weeks. Higher risk CMV-mismatched recipients (Donor+/Recipient-) were treated for the 3

post-transplant months. Sepsis was defined accordingly to international definition and managed according to the surviving sepsis campaign guidelines [17]. Lung-protective ventilation strategy was applied including tidal volume of 6 ml/kg of predicted body weight. Patients presenting an acute respiratory distress syndrome (ARDS) were ventilated according to an algorithm that was previously published by our center [18]. Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) therapy was indicated for elective situations [19].

2.3. Data collection

All immune samples monitoring realized within the first 60 po days were recorded for evaluation. In our center, immune monitoring is routinely performed after lungTx, once a week during the first stay of hospitalization. Clinical and demographic characteristics of patients were collected from their electronic clinical records. Sepsis group was defined by severe sepsis or septic shock occurring during the ICU according to international guidelines [20]. Primary graft dysfunction and acute rejection was defined according to international standardized criteria [21, 22]. Failure of organs and severity of multiple organ dysfunction syndrome was assessed by Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scale on admission [23].

2.4. T-lymphocyte counts and monocyte HLA-DR expression

Total lymphocyte and monocytes counts were obtained from hematological laboratory reports (ADVIA hematology analyzer, Bayer, Leverkusen, Germany). T lymphocyte subsets: T cells (CD3+), CD4 T cells (CD3+/CD4+), CD8 T cells (CD3+/CD8+), and mHLA-DR expression were assessed by flow cytometry [26]. Phenotyping was performed in fresh EDTA whole blood (50 μ L) within 4 h after sampling. Tubes were prepared with the system COULTER® TQ-Prep (Beckman Coulter, Marseille, France), which included a red blood lyse. Whole blood was stained with 10 μ L of each antibody (Beckman Coulter) for 15 min including anti-CD45 FITC (fluorescein), clone B3821F4A; anti-CD4-RD1 (rhodamine), clone T4; anti-CD8-ECD (phycoerythrin-Texas Red), clone T8; anti-CD3-PC5 (phycoerythrin-cyanin 5), clone UCHT1; anti-HLA-DR-PB (pacific blue), clone IMM357. Cell phenotyping was performed with a Navios flow cytometer (Beckman Coulter) and data were directly analyzed on the acquisition software.

Monocytes were identified on the basis of side scatter (SSC) characteristics and CD45 expression Fig. S1. Then, mHLA-DR expression was measured on the whole population of selected monocytes on a monoparametric histogram and expressed as Mean of Fluorescence Intensity (MFI).

2.5. Statistical analysis

Qualitative variables are expressed as percentages and continuous variables as medians [IQR] or mean ($\pm$ SD), according to the distribution (Shapiro-Wilk test). Comparisons of qualitative variables were performed using the chi-square test. Comparisons of continuous variables were performed using Student's *t*-test or Mann-Whitney test, according to the distribution. The statistical significance was defined as *p*-value < .05. Data analyses were performed using R studio software, version 3.4.0 (www.R-project.org/). Figures were performed with the « ggplot2 » library.

3. Results

3.1. Patient characteristics

Seventy-two lung Tx procedures were performed in our center during the study period. Thirty-five patients in whom HLA-DR expression was not evaluated were subsequently not included in this analysis. A total of 37 lung Tx recipients were finally enrolled in the analysis, 18

Protocol of immunosuppressive treatment

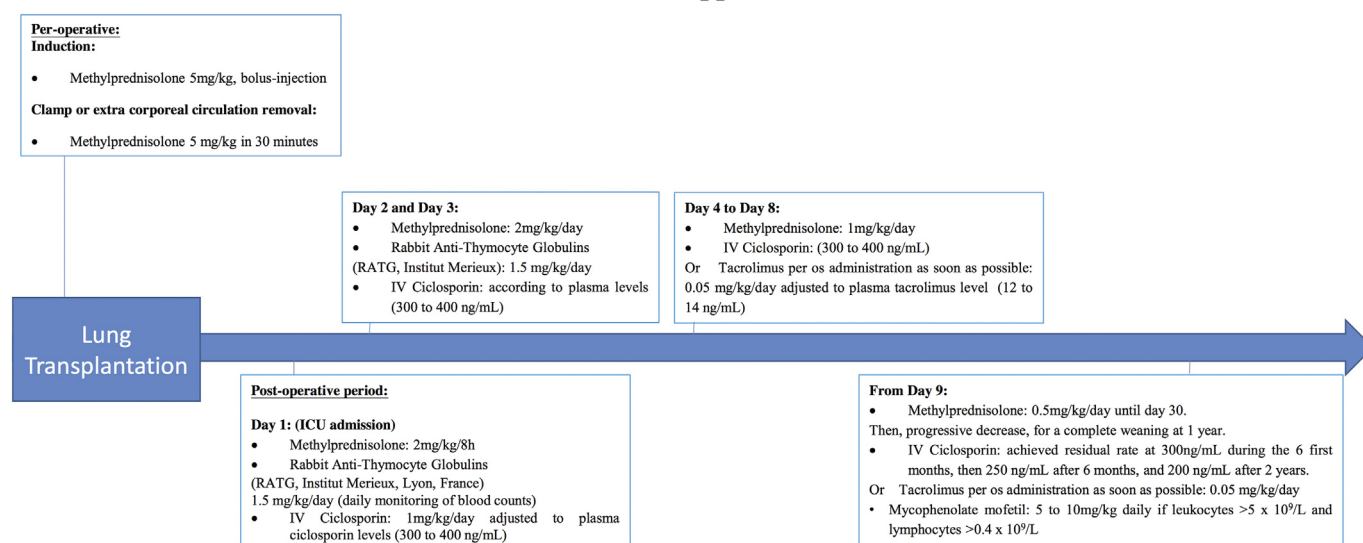


Fig. 1. Protocol of immunosuppressive treatment.

Immunosuppressive regimen (induction and maintenance therapy) consisted in methylprednisolone, rabbit antithymocyte globulins (RATG) and ciclosporine or tacrolimus. It was adjusted individually, with immunosuppressive plasma level monitoring, and according to known toxic side effects.

in the control group and 19 in the sepsis group. Diabetes was more frequent in the septic group. There was no difference between the 2 groups on ICU admission, except for the SOFA score and the occurrence of a primary graft dysfunction which were higher in the sepsis group and the number of patients who needed ECMO at the end of the procedure (more in the sepsis group), Table 1.

Lung was the primary source of infection during the ICU stay in 17 recipients (89%). The median occurrence of the sepsis was 10 [7–14] days post-lung Tx. There were 14 (74%) documented bacterial infection. *Pseudomonas aeruginosa*, $n = 6$ (32%) and *Staphylococcus* sp., $n = 5$ (26%) were the predominant pathogens. Causal agents are reported in Table S1. Sepsis was associated with more vasopressor requirements, more tracheotomy, a longer duration of both mechanical ventilation and ICU stay. In contrast, graft rejection rates and ICU mortality were similar among the two groups (Table 2).

3.2. T-lymphocytes reconstitution

In the whole set of recipients, peripheral blood T-lymphocytes were the lowest within the first week post-transplant (57 cells/ μL [13–190]) and then increased significantly during the second week compared to the first week (337 cells/ μL [188–568], $p = .006$) and after (740 cells/ μL [415–1242], compared to the first, $p < .001$, and the second week, $p < .001$).

However, the kinetics between the septic group and the control group was similar at the different time-points (Fig. 2). The analysis of CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subsets showed no differences between the two groups (Table 3).

3.3. Monocytes reconstitution

Monocytes counts were low on both groups during the first week post-lung Tx. (305 cells/ μL [197–350] in the non-septic group versus 260 cells/ μL [180–580] in the septic group, $p = .61$). Then, monocytes counts raised during the second week (495 cells/ μL [360–540] in the non-septic group vs 480 cells/ μL [365–595] in the septic group, $p = .96$) and after (800 cells/ μL 480–920] in the septic group vs 580 cells/ μL [455–735] in the septic group, $p = .2$) without any difference between the two groups.

3.4. mHLA-DR expression reconstitution

mHLA-DR was similar during the first week post-lung Tx in both groups (MFI: 2.7 [1.6–4.9] in the non-septic group versus 2.3 [1.2–2.8] in the septic group, $p = .40$). However, while a significant rise was observed after the first week in the control group (second week MFI: 4.7 [4.3–7.1] and 8.0 [5.1–10.5] thereafter, $p = .03$ and $p = .01$ compared to the first week respectively), there was no change in the septic group (second week MFI: 2.8 [2.1–3.7], and 2.3 [1.3–3.5] thereafter, $p = .86$ and $p = .65$ compared to the first week respectively), Fig. 2.

4. Discussion

Despite recent advances in management of immunosuppressive regimens after solid organ transplantation [3], there is little data on the analysis of peripheral blood leukocytes in lung Tx. The present study provides detailed the kinetics of peripheral blood lymphocyte subsets in the immediate post-operative period of lung Tx patients. We showed a profound and sustained decrease of T-lymphocytes. No differences were observed in the lymphocyte subpopulations between non-septic and septic recipients. This suggests that sepsis had no effect on the rate of CD4+ and CD8+ T cell reconstitution after ATG treatment. mHLA-DR expression, which surrogates the innate immunity, is strongly impaired in the patients who developed sepsis during the ICU stay.

Thirty-five out of 72 recipients were excluded in order to obtain a homogeneous set of biological of data performed in the same laboratory. However, our cohort remains representative of previously published lung Tx cohorts with recipients undergoing lung Tx for COPD (40.5%) and pulmonary fibrosis (40.5%) [21].

Sepsis occurred in 19 (51%) recipients. It was associated with higher morbidity, increasing by 6 the duration of ICU stay and by 10 the mechanical ventilation duration. These findings emphasize the critical role for infection control in those patients. In addition, the presence of septic shock in surgical patients is associated with an increased mortality, although our cohort did not confirm this result, probably due to our low number of patients [24]. Interestingly, the demographic features of septic patients were similar to those of the control group.

Our results showed a higher admission SOFA score at the ICU admission, which is a strong factor for poor outcome in septic shock in the septic group [25]. A larger recourse to ECMO was reported in the septic

Table 1
Characteristics of the recipients on ICU admission.

Variables	All (n = 37)	Control (n = 18)	Sepsis (n = 19)	p value
Age (years)	47 [39–54]	45 [35–53]	47 [43–54]	0.54
Sex (men), n (%)	23 (62)	11 (61)	12 (63)	0.90
BMI (kg/m ²)	22.6 ± 4.2	22.1 ± 4.7	23.0 ± 3.6	0.54
Underlying disease, n (%)				0.62
Cystic fibrosis	6 (16)	2 (11)	4 (21)	
Emphysema	16 (43)	9 (50)	7 (37)	
Pulmonary Fibrosis	15 (41)	7 (39)	8 (42)	
Comorbidities, n (%)				
PH	13 (35)	7 (39)	6 (32)	0.64
Smoking history	18 (49)	10 (56)	8 (42)	0.41
Alcohol history	5 (14)	2 (11)	3 (16)	0.94
Drug abuse history	1 (3)	1 (6)	0 (0)	0.14
Diabetes	7 (19)	1 (6)	6 (32)	0.04
Corticosteroids	15 (41)	7 (39)	8 (42)	0.84
Immuno-suppressive	2 (6)	1 (6)	1 (5)	0.97
CMV mismatch	3 (8)	2 (11)	1 (5)	0.48
Bronchial colonization	18 (49)	6 (33)	12 (63)	0.07
Surgical procedure				
Ischaemic time (min)	335 [294–390]	321 [276–368]	342 [297–417]	0.22
SLTx, n (%)	2 (5)	1 (6)	1 (5)	0.97
DLTx, n (%)	35 (95)	17 (94)	18 (95)	
ICU Admission				
SOFA (score)	7 [6–9]	6 [4–7]	9 [7–9]	0.01
SAPS 2 (score)	36.6 ± 8.5	34.3 ± 10.5	38.7 ± 5.5	0.13
PaO ₂ /FiO ₂ ratio (mmHg)	200 [130–300]	240 [175–300]	130 [96–288]	0.10
Lactates (mmol/L)	2.3 [1.7–3.7]	2.9 [1.8–4.0]	2.2 [1.7–3.6]	0.96
PCT (µg/L)	2.0 [0.9–6.8]	1.5 [0.8–4.4]	4.1 [1.1–11.1]	0.18
ECMO, n (%)	9 (24)	0 (0)	9 (47)	< 0.001
NO, n (%)	4 (11)	2 (11)	2 (11)	0.95
Vasopressors, n (%)	33 (89)	14 (78)	19 (100)	0.03
PGD (grade)	0 [0–2]	0 [0–0]	1 [0–3]	0.01

PH: Pulmonary hypertension; CMV: Cytomegalovirus; SLTx: Single lung transplantation; DLTx: Double lung transplantation; ICU: Intensive care unit; PCT: Procalcitonin plasma level; ECMO: Extra-corporeal membrane oxygenation; NO: Nitric oxide; PGD: Primary graft dysfunction. Results are expressed as mean ± SD or median [interquartile] and comparisons between groups performed using Student's *t*-test or Mann-Whitney test, according to the distribution.

Table 2

ICU outcome according to the septic and non-septic groups. Results are expressed as mean ± SD or median [interquartile] and comparisons between groups performed using Student's *t*-test or Mann-Whitney test, according to the distribution.

ICU outcome	All (n = 37)	Control (n = 18)	Sepsis (n = 19)	p value
ICU stay (days)	17 [9–46]	8 [5–12]	46 [28–58]	< 0.001
Days with mechanical ventilation	10 [3–41]	3 [2–7]	41 [20–54]	< 0.001
Days with vasopressors	4 [2–5]	2 [1–3]	5 [5–9]	< 0.001
Tracheotomy, n (%)	17 (46)	2 (11)	15 (79)	< 0.001
Graft rejection, n (%)	6 (16)	3 (17)	3 (16)	0.94
Liver failure, n (%)	1 (3)	0 (0)	1 (6)	0.32
Kidney failure, n (%)	9 (24)	2 (11)	7 (37)	0.07
ICU survivor, n (%)	34 (92)	17 (94)	17 (90)	0.58

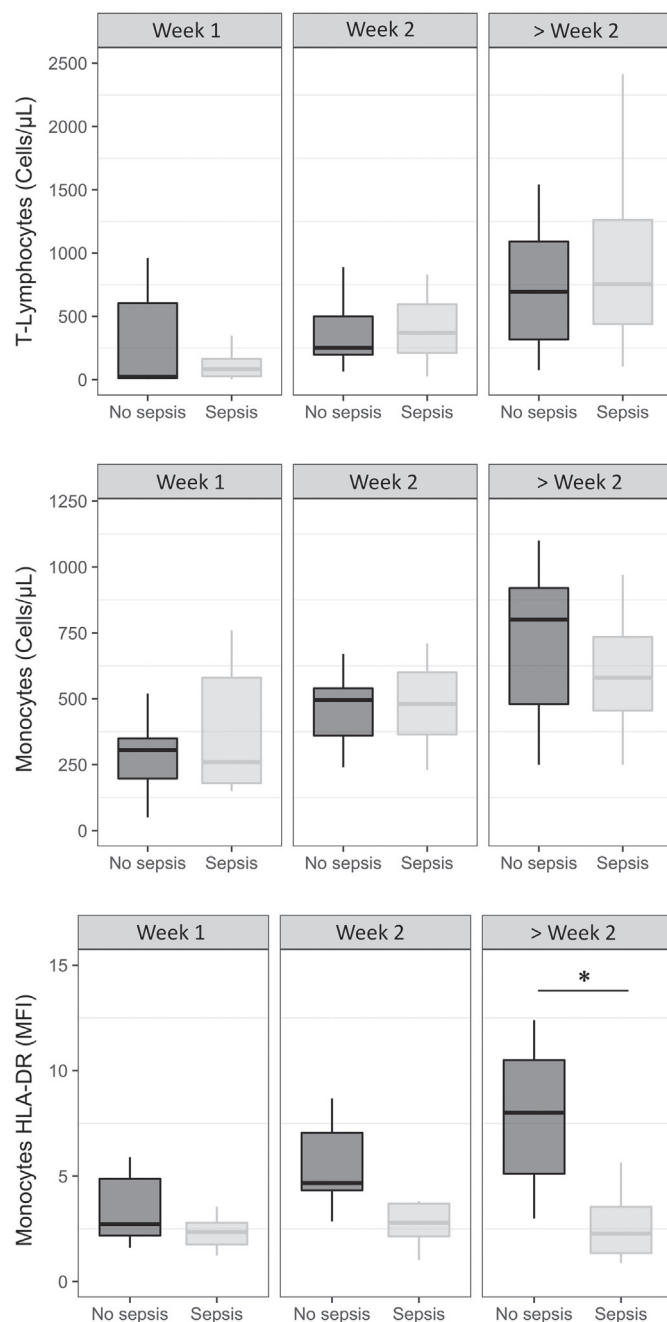


Fig. 2. T-Lymphocyte, monocytes and mHLA-DR expression kinetics after lung transplantation according to sepsis. The boxplots represent the counts in the first post-transplant week [0–7 days], in the second week [8–14 days] and later [> 14 days]. The boxplots correspond to the medians with inter-quartile range (or distance between the first and third quartiles); the lower and upper whiskers extend from the hinge to the lowest and highest (respectively) values that are within 1.5 x IQR of the hinge. The comparisons of cell counts were performed using the Mann-Whitney test according to the non-normal distribution; * *p* < .05.

group, reflecting the increased severity. This finding suggests that ECMO support should be considered as a potential increased risk of sepsis in lung Tx patients, although the design of our study shows association and not causative links. ECMO impairs the host immune system and triggers an inflammatory response. Due to the presence of foreign surface and shear stress, an ECMO-related SIRS was described, resulting in neutrophil activation [26]. Hence, the potential increased probability of sepsis should be included in the ratio between benefit and risk in lung

Table 3

T-lymphocytes subset (CD4+ and CD8+) counts over time according to sepsis. Results are expressed as median [interquartile] and the comparisons of cell counts between groups were performed using the Mann-Whitney test according to the non-normal distribution. *Comparison with the first week in the same group; *p < .05; **p < .01 and ***p < .001.

Lymphocyte subsets	Time (days)	Control n = 18	Sepsis n = 19	p value
CD4+ T-lymphocytes	[0–7]	7 [4–68]	32 [10–77]	0.88
	[8–14]	152 [63–309]*	181 [104–384]***	0.37
	> 14	395 [189–653]***	393 [208–680]***	0.74
CD8+ T-lymphocytes	[0–7]	11 [3–55]**	40 [8–92]	0.39
	[8–14]	110 [95–170]*	143 [97–159]*	0.42
	> 14	281 [111–440]***	350 [181–585]***	0.05

Tx recipients before initiating ECMO.

The monitoring of immunosuppressive therapy may be critical to prevent acute rejection. Indeed, this treatment comes along with adverse effects including metabolic disorder, malignancy complications and infections [21]. All patients received a combined immunosuppressive regimen impacting mostly T-cells in the early post-operative phase [27–29]. However, this effect can be attributed to several reasons including steroids and calcineurin inhibitors known to inhibit T-cells functions and proliferation [30]. In our study, the effect of induction therapy decreased progressively, with a recovery independent from the sepsis occurrence.

In our cohort, monocytes from septic patients had a persistent decrease in mHLA-DR expression. This phenomenon has been reported in sepsis-induced immunosuppression. [31] mHLA-DR is considered as a reliable marker to monitor immune alterations in the critically ill patients and identify patients at increased risk of secondary nosocomial infections and death [32]. Low level of mHLA-DR expression was used as inclusion criteria for administration of growth factor (GM-CSF) in ICU patients, resulting in a decrease duration of mechanical ventilation in the intervention group [33]. Interestingly, Hoffman et al. reported that pediatric recipients with persistent low mHLA-DR expression was associated with an increased risk of post-lung Tx pneumonia [10]. Thus, mHLA-DR could serve as a surrogate marker of immune response in order to modulate the immunosuppressive drugs. Hence, the host response in lung Tx recipients was characterized by an impairment of innate immunity rather than that of adaptive immunity. Thus, reducing the pharmacologically induced adaptive immunosuppression does not appear necessarily as the best strategy to avoid healthcare-associated infections in such patient. [34, 35]. A low mHLA-DR expression in those patients could involve an early antibiotic treatment (if clinical sepsis) a reduced use of immunosuppressive drugs (if possible) and adding GM-CSF in case that should be better identified in futures studies.

Our study has several limitations. This is a retrospective, monocentric analysis performed on a small number of patients. Thus, this design does not allow drawing definitive conclusions about the immune response of lung Tx recipients. mHLA-DR is now preferentially measured through a quantitative procedure (number of antibodies per monocyte) [36]. Unfortunately, this method was not available on a routine basis at time we performed the present study. These encouraging results should be confirmed in a prospective study to assess the prognostic value of mHLA-DR in predicting the risk of healthcare associated infections in the early phase after lung Tx.

5. Conclusion

We report here the first description of immune reconstitution of mHLA-DR after lung Tx in ICU patients. Within the limitations of our study, sepsis is associated with a lack of mHLA-DR recovery suggesting impaired innate immunity. mHLA-DR expression represents an interesting tool to monitor immune alterations in those septic patients.

Altogether, these preliminary results enhance the concept of close immune monitoring in lung Tx recipients in order to predict evolution and affine therapeutic management.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.trim.2018.08.001>.

Funding information

Support was provided solely from institutional and departmental sources.

Conflict of interest disclosure

Conflict of interest: JT is a part-time employee of an in-vitro diagnostic company None of the other authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of the presented manuscript or other conflicts of interest to disclose.

Acknowledgment

None.

References

- [1] R.D. Yusen, L.B. Edwards, A.Y. Kucheryavaya, C. Benden, A.I. Dipchand, F. Dobbels, et al., The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart–lung transplant report—2014; focus theme: Retransplantation, *J. Heart Lung Transplant.* 33 (2014) 1009–1024.
- [2] R.R. Hachem, L.B. Edwards, R.D. Yusen, M.M. Chakinala, G. Alexander Patterson, E.P. Trulock, The impact of induction on survival after lung transplantation: an analysis of the International Society for Heart and Lung Transplantation registry: the impact of induction on graft survival, *Clin. Transpl.* 22 (2008) 603–608.
- [3] J.L. Scheffert, K. Raza, Immunosuppression in lung transplantation, *J. Thorac. Dis.* 6 (2014) 1039–1053.
- [4] R.R. Hachem, R.D. Yusen, M.M. Chakinala, B.F. Meyers, J.P. Lynch, A.A. Aloush, et al., A randomized controlled trial of tacrolimus versus cyclosporine after lung transplantation, *J. Heart Lung Transplant.* 26 (2007) 1012–1018.
- [5] K. McNeil, A.R. Glanville, T. Wahlers, C. Knoop, R. Speich, R.D. Mamelok, et al., Comparison of mycophenolate mofetil and azathioprine for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome in de novo lung transplant recipients, *Transplantation* 81 (2006) 998–1003.
- [6] P. Vallin, O. Déry, S. Béland, F. Bouchard-Boivin, I. Houde, S.A. De Serres, Impaired secretion of TNF- α by monocytes stimulated with EBV peptides associates with infectious complications after kidney transplantation, *Transplantation* 102 (2018) 1005–1013.
- [7] M. Fernández-Ruiz, F. López-Medrano, L.M. Allende, A. Andrés, A. García-Rey, C. Lumbrales, et al., Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation, *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ. Transplant.* 27 (2014) 674–685.
- [8] J. Furuzawa-Carballeda, G. Lima, P. Simancas, D. Ramos-Bello, M. Simancas, I.C. Bostock, et al., Peripheral regulatory cells immunophenotyping in kidney transplant recipients with different clinical profiles: a cross-sectional study, *J. Transp. Secur.* 2012 (2012) 256960.
- [9] S.A. Calarota, A. Chiesa, A.D. Silvestri, M. Morosini, T. Oggionni, P. Marone, et al., T-lymphocyte subsets in lung transplant recipients: association between nadir CD4 T-cell count and viral infections after transplantation, *J. Clin. Virol.* 69 (2015) 110–116.
- [10] J.A. Hoffman, K.I. Weinberg, C.G. Azen, M.V. Horn, L. Dukes, V.A. Starnes, et al., Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral blood monocytes and the risk of pneumonia in pediatric lung transplant recipients, *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 6 (2004) 147–155.
- [11] R.S. Hotchkiss, I.E. Karl, The pathophysiology and treatment of Sepsis, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 138–150.
- [12] D. Annane, E. Bellissant, J.-M. Cavallion, Septic shock, *Lancet* 365 (2005) 63–78.
- [13] J. Cabrera-Perez, S.A. Condotta, V.P. Badovinac, T.S. Griffith, Impact of sepsis on CD4 T cell immunity, *J. Leukoc. Biol.* 96 (2014) 767–777.
- [14] A. Chéron, G. Monneret, C. Landelle, B. Floccard, B. Allaouchiche, Diminution de l'expression monocyttaire de HLA-DR et risque d'infection hospitalière, *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* 29 (2010) 368–376.
- [15] F. Venet, A. Lepape, G. Monneret, Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions, *Crit. Care* 15 (2011) 231.
- [16] G. Monneret, F. Venet, A. Pachot, A. Lepape, Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony, *Mol. Med.* 14 (2008) 64–78.
- [17] R.P. Dellinger, M.M. Levy, J.M. Carlet, J. Bion, M.M. Parker, R. Jaeschke, et al., Surviving Sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008, *Crit. Care Med.* 36 (2008) 296–327.
- [18] L. Papazian, J.-M. Forel, A. Gacouin, C. Penot-Ragon, G. Perrin, A. Loundou, et al.,

- Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 1107–1116.
- [19] A. Roch, S. Hraiech, E. Masson, D. Grisoli, J.-M. Forel, M. Boucekine, et al., Outcome of acute respiratory distress syndrome patients treated with extracorporeal membrane oxygenation and brought to a referral center, *Intensive Care Med.* 40 (2014) 74–83.
- [20] R.C. Bone, R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, W.J. Sibbald, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM consensus conference committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, *Chest* 101 (1992 Jun) 1644–1655.
- [21] J.D. Christie, L.B. Edwards, P. Aurora, F. Dobbels, R. Kirk, A.O. Rahmel, et al., The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-second official adult lung and heart-lung transplantation report—2015; focus theme: early graft failure, *J. Heart Lung Transplant.* 34 (2015) 1264–1277.
- [22] S. Stewart, M.C. Fishbein, G.I. Snell, G.J. Berry, A. Boehler, M.M. Burke, et al., Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection, *J. Heart Lung Transplant.* 26 (2007) 1229–1242.
- [23] J.L. Vincent, R. Moreno, J. Takala, S. Willatts, A. De Mendonça, H. Bruining, et al., The SOFA (Sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the working group on Sepsis-related problems of the European Society of Intensive Care Medicine, *Intensive Care Med.* 22 (7) (1996 Jul) 707–710.
- [24] L.J. Moore, B.A. McKinley, K.L. Turner, S.R. Todd, J.F. Sucher, A. Valdivia, R.M. Sailors, L.S. Kao, F.A. Moore, The epidemiology of sepsis in general surgery patients, *J. Trauma* 70 (2011) 672–680.
- [25] S. Medam, L. Zieleskiewicz, G. Duclos, K. Baumstarck, A. Loundou, J. Alingrin, et al., Risk factors for death in septic shock: a retrospective cohort study comparing trauma and non-trauma patients, *Medicine (Baltimore)* 96 (2017) e9241.
- [26] Q. Chen, W. Yu, J. Shi, J. Shen, Y. Hu, T. Gao, et al., The effect of venovenous extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) therapy on immune inflammatory response of cerebral tissues in porcine model, *J. Cardiothorac. Surg.* 8 (2013 Aug 29) 186.
- [27] H. Vacher-Coponat, C. Brunet, V. Moal, A. Loundou, E. Bonnet, L. Lyonnet, et al., Tacrolimus/mycophenolate mofetil improved natural killer lymphocyte reconstitution one year after kidney transplant by reference to cyclosporine/azathioprine, *Transplantation* 82 (4) (2006 Aug 27) 558–566.
- [28] M. Büchler, H. Longuet, R. Lemoine, F. Herr, P. Gatault, G. Thibault, et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of two different rabbit antithymocyte globulin dosing regimens: results of a randomized trial, *Transpl. Immunol.* 28 (2013) 120–126.
- [29] M.M.L. Kho, A.P. Bouvy, M. Cadogan, R. Kraaijeveld, C.C. Baan, W. Weimar, The effect of low and ultra-low dosages thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients, *Transpl. Immunol.* 26 (2012) 186–190.
- [30] K. Migita, K. Eguchi, Y. Kawabe, T. Origuchi, M. Tominaga, S. Nagataki, FK506 potentiates steroid-induced T-cell apoptosis, *Transplantation* 64 (1997) 1365–1369.
- [31] R.S. Hotchkiss, G. Monneret, D. Payen, Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach, *Lancet Infect. Dis.* 13 (2013) 260–268.
- [32] A. Cheron, B. Floccard, B. Allaouchiche, C. Guignant, F. Poitevin, C. Malcus, et al., Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma, *Crit. Care Lond. Engl.* 14 (2010) R208.
- [33] C. Meisel, J.C. Schefold, R. Pschowski, et al., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (2009) 640–648.
- [34] Q. Chen, W. Yu, J. Shi, J. Shen, Y. Hu, T. Gao, et al., The effect of venovenous extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) therapy on immune inflammatory response of cerebral tissues in porcine model, *J. Cardiothorac. Surg.* 8 (2013) 186.
- [35] F. Venet, A.-C. Lukaszewicz, D. Payen, R. Hotchkiss, G. Monneret, Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies, *Curr. Opin. Immunol.* 25 (2013) 477–483.
- [36] J. Demaret, A. Walencik, M.C. Jacob, J.F. Timsit, F. Venet, A. Lepape, G. Monneret, Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples, *Cytometry B Clin. Cytom.* 84 (1) (2013) 59–62.

ANNEXE 4

LETTER

Open Access



Massive increase in monocyte HLA-DR expression can be used to discriminate between septic shock and hemophagocytic lymphohistiocytosis-induced shock

Solenn Remy¹, Morgane Gossez^{2,3}, Alexandre Belot^{4,5}, Jack Hayman², Aurelie Portefaix⁶, Fabienne Venet^{2,3}, Etienne Javouhey¹ and Guillaume Monneret^{2,3,7*} 

Keywords: Immune response, Septic shock, Biomarker, Hemophagocytic lymphohistiocytosis

Clinical presentations of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and septic shock share many similarities, including multiple organ dysfunction and overall clinical and biological symptoms. However, these life-threatening conditions require specific and opposing treatments. Currently, no single biomarker is available to differentiate septic shock from HLH at patient admission [1, 2]. HLH is classified as a primary (genetically inherited) or a secondary, i.e., induced by various inflammatory conditions (viral infections, autoimmune processes, lymphoid malignancies, or drug allergies), immune disorder. We report here the case of a young woman with febrile shock which proved to be a HLH caused by drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS). As septic shock was initially suspected, the patient benefited from broad immunological screening during the first week of evolution [3]. Strikingly, this revealed massively increased expression of monocyte human leukocyte antigen-DR (mHLA-DR) at 137,021 ABC (antibody bound per cell), even though expected values in septic shock are usually drastically decreased [3]. In addition, a positive response to increasing doses of corticosteroids was observed over time (Fig. 1). More precisely, while the patient's mHLA-DR expression was measured at 137,021 ABC at admission, it decreased to 38,961 ABC after the introduction of corticosteroids (day

3). Following the reactivation of inflammatory processes (day 5), mHLA-DR rose again (66,829 ABC). Finally, mHLA-DR returned to a normal range after increasing corticosteroid doses (20,499 ABC, day 8). All clinical features are provided in Additional file 1.

In the present patient, the extremely increased inaugural mHLA-DR value (i.e., 137,021 ABC) helped to unequivocally exclude a diagnosis of septic shock. Indeed, in our experience (more than 600 septic shock patients monitored over several years), the vast majority of mHLA-DR values measured within the first 3 days after septic shock are reported to be < 30,000 ABC and mostly found below 10,000 ABC (normal values ranged from 15,000 to 40,000 ABC). This agrees with pathophysiology since HLH is secondary to overproduction of interferon- γ (IFN- γ), a cytokine known to be a strong inducer of mHLA-DR expression, whereas sepsis induces down-regulation of mHLA-DR expression.

In conclusion, mHLA-DR may discriminate septic shock from HLH at admission despite both situations with multiple organ dysfunction sharing very common clinical and biological features (e.g., sCD25, elevated ferritin levels) [4, 5]. This result obviously needs further assessment in various types of HLH. Upon confirmation, as these two deadly conditions (i.e., septic shock and HLH) would require opposing treatments, mHLA-DR may be of crucial help for clinicians regarding patients' care and management.

* Correspondence: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

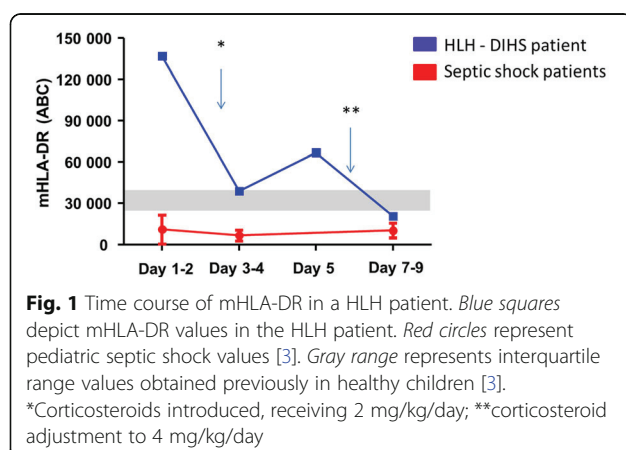
²Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, E. Herriot Hospital, 69003 Lyon, France

³EA 7426, Pathophysiology of injury-induced immunosuppression (University Claude Bernard Lyon 1, BioMérieux, Hospices Civils de Lyon), E. Herriot Hospital, 69003 Lyon, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Additional file

Additional file 1: Additional online information. (DOCX 27 kb)

Abbreviations

ABC: Antibody bound per cell; DIHS: Drug-induced hypersensitivity syndrome; HLH: Hemophagocytic lymphohistiocytosis; IFN- γ : Interferon- γ ; mHLA-DR: Monocyte human leukocyte antigen-DR

Funding

This work was supported by Hospices Civils de Lyon and University Claude Bernard Lyon 1.

Availability of data and materials

According to the French National Data Protection Commission, we are not authorized to provide the individual clinical data.

Authors' contributions

EJ and GM conceptualized and designed the PedIRIS study and reviewed and revised each draft of the manuscript. SR, AP, and AB participated in patient treatment and reviewed and revised the manuscript. SR, MG, FV, and JH performed biological analysis and reviewed and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

This case report belongs to the PedIRIS study. This observational prospective clinical study was approved by our Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes, Lyon Sud-Est II, number 2014-010-2, in accordance with Article L1121-1 of the French Public Health Code). According to legislation in place at the time of the study, this study required only the non-opposition of the study participants (written informed consent was not required). An information leaflet was systematically distributed to holders of parental authority. Participants and/or holders of parental authority could withdraw consent at any time. The study was registered: Pediatric Immune Response to Infectious Shock (PedIRIS), NCT02848144.

Consent for publication

Written informed consent for publication of their clinical details was obtained from the parent of the patient. A copy of the consent form is available for review by the Editor of this journal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Hospices Civils de Lyon, Paediatric Intensive Care Unit, Mother and Children University Hospital, 59 Boulevard Pinel, 69500 Bron, France. ²Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, E. Herriot Hospital, 69003 Lyon, France. ³EA 7426, Pathophysiology of injury-induced immunosuppression (University Claude Bernard Lyon 1, BioMérieux, Hospices Civils de Lyon), E. Herriot Hospital, 69003 Lyon, France. ⁴Hospices Civils de Lyon, Paediatric Nephrology, Rheumatology, Dermatology Unit, National Referee Centre for pediatric-onset Rheumatism and autoimmune diseases (RAISE), Mother and Children University Hospital, 59 Boulevard Pinel, 69500 Bron, France. ⁵Université de Lyon, INSERM U1111, CIRI, Lyon, France. ⁶EPICIME-CIC 1407 de Lyon, Inserm, Service de Pharmacologie Clinique, CHU-Lyon, Bron, France. ⁷Cellular Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot – Hospices Civils de Lyon, France Pavillon E – 5 place d'Arsonval, 69437 Lyon, Cedex 03, France.

Received: 20 July 2018 Accepted: 30 July 2018

Published online: 11 September 2018

References

- Castillo L, Carcillo J. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis and severe sepsis/ systemic inflammatory response syndrome/multiorgan dysfunction syndrome/macrophage activation syndrome share common intermediate phenotypes on a spectrum of inflammation. *Pediatr Crit Care Med*. 2009;10(3):387–92.
- Machowicz R, Janka G. Similar but not the same: differential diagnosis of HLH and sepsis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;114:1–12.
- Remy S, Kolev-Descamps K. Occurrence of marked sepsis-induced immunosuppression in pediatric septic shock: a pilot study. *Ann Intensive Care*. 2018;8(1):36.
- Rosario C, Zandman-Goddard G. The hyperferritinemic syndrome: macrophage activation syndrome, Still's disease, septic shock and catastrophic antiphospholipid syndrome. *BMC Med*. 2013;11:185.
- Møller HJ, Moestrup S. Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: prediction of survival by soluble CD163. *Crit Care Med*. 2006; 34(10):2561–6.

ANNEXE 5

RESEARCH

Open Access



Occurrence of marked sepsis-induced immunosuppression in pediatric septic shock: a pilot study

Solenn Remy¹ , Karine Kolev-Descamps¹, Morgane Gossez², Fabienne Venet^{2,3}, Julie Demaret², Etienne Javouhey¹ and Guillaume Monneret^{2,3*}

Abstract

Background: While the process of sepsis-induced immunosuppression is now well described in adults, very little information is available on immune functions in pediatric sepsis. The current study investigated this in children with septic shock by performing immunomonitoring, including both innate (monocyte human leukocyte antigen-DR, mHLA-DR, expression) and adaptive immunity (lymphocyte subsets count), as well as cytokine concentrations (IL-6, IL-8, IL-10, IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ). Subsequent objectives were to assess the associations between inflammatory response, potential immunosuppression and secondary acquired infection occurrence.

Methods: Single-center prospective observational study, including children aged between 1 month and 18 years admitted to pediatric intensive care unit (PICU) for septic shock. Age-matched controls were children hospitalized for elective surgery without any infectious criteria. Blood was sampled at day 1–2, 3–5, and 7–9 after sepsis onset. mHLA-DR and lymphocyte subsets count were measured by flow cytometry and cytokine concentrations by Luminex technology.

Results: A total of 26 children and 30 controls were included. Patients had lymphopenia, and mHLA-DR levels were significantly lower than controls at each time point ($p < 0.0001$). All cytokines peaked at day 1–2. Children with secondary acquired infection had lower day 3–5 mHLA-DR and higher pro-inflammatory cytokine concentrations (IL-6, IL-8 and TNF- α) at day 1–2 compared to children without secondary acquired infection.

Conclusions: The higher initial inflammatory cytokine production was, the more innate immunity was altered, while evaluated by low mHLA-DR expression. Children with decreased mHLA-DR expression developed more secondary acquired infections. Upon confirmation in multicenter cohorts, these results pave the way for immunostimulation for the most immunosuppressed children in order to prevent nosocomial infections in PICU.

Trial registration PedIRIS study NCT02848144. Retrospectively registered 28 July 2016

Keywords: Septic shock, Immunosuppression induced, Children

Background

Despite advances in critical care management, septic shock remains one of the most important causes of mortality and morbidity in children worldwide [1]. As for adults, the inability of adjunctive therapies to mitigate

the deleterious effects of this condition indicates that it is likely that initial hypotheses for sepsis pathophysiology have been inadequately addressed [2]. In adults, it is now agreed that sepsis deeply perturbs immune balance by inducing a strong systemic inflammatory response and a concomitant anti-inflammatory process, acting as a negative feedback. This compensatory response may secondarily become harmful as most immune functions are compromised, and thus sepsis-induced immune alterations may play a major role in the decreased resistance

*Correspondence: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

² Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, E. Herriot Hospital, 69003 Lyon, France

Full list of author information is available at the end of the article

to secondary acquired infections in patients who initially survive [3]. This immunosuppressive state is characterized by both abnormal innate and adaptive immune responses. In particular, patients mostly present with marked lymphopenia and decreased expression in monocyte human leukocyte antigen-DR (mHLA-DR). The latter remains, to date, the key parameter of patient monitoring and its diminished expression has been reported to be associated with increased mortality and nosocomial infection rate in adults [4–6]. In this context, and as it is already the case for cancer immunotherapy, targeted treatments aimed at rejuvenating immune responses in adult septic patients (e.g., GM-CSF, Interleukin-7, anti-PD-1/-L1) are now envisaged [7–10]. In comparison with adults, data are very scarce in children with septic shock. The impact of this altered immune response on secondary infections is poorly reported in children affected by septic shock. In order to envisage therapeutic interventions to restore immune function in children, a reliable biomarker is required to identify children at highest risk of secondary acquired infection or mortality. Such a marker is currently lacking in children. Most pediatric results are rarely specific of septic shock. They refer, as a whole, to various pediatric intensive care unit (PICU) admission causes (surgery, organ dysfunctions) [11–14], or are limited to particular cases of preterm neonates [15, 16]. Thus, the objective of the present prospective observational study was to investigate whether pediatric septic shock patients present immune alterations similar to those seen in adults. For this, immunomonitoring was performed during the first week after sepsis onset. This monitoring included mHLA-DR, lymphocyte subsets count, and phenotyping as well as measurement of plasma cytokine concentrations: interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra). As control values may depend on age, and in the absence of mHLA-DR reference range in pediatrics, healthy children were also investigated to explore mHLA-DR expression during the first years of life.

Methods

Study population

This single-center, prospective study was held in PICU from a tertiary academic hospital (23 beds mixed medical-surgical unit, >1100 admissions/year). Children, aged from 1 month to 18 years, were included prospectively during 24 h of PICU admission, if they presented septic shock, defined by “Surviving Sepsis Campaign” and Goldstein’s criteria [17, 18]. Exclusion criteria were: non-septic shock, chronic inflammatory disease, long-term corticosteroid treatment, transplantation and/or

immunosuppressive therapy, immunodeficiency syndrome, malignant tumors. Opposition from the child and/or parent/holder of parental authority also constituted exclusion criteria. Controls were age-matched to the case group and identified among outpatients admitted for a scheduled surgery, without any criteria of infection. Exclusion criteria were the same as the case group. Three age subgroups were defined: 1 month to 2, 2–8, and >8 years, according to the physiological age-based development of immunity in children [19].

Clinical data and definitions

Clinical data were collected prospectively and obtained from the electronic medical record. At admission (day 1), severity of illness was evaluated using the pediatric index of mortality 2 (PIM2) [20]. Organ failure was assessed by the measurement of PEdiatric Logistic Organ Dysfunction Score, version 2 (PELOD-2) at day 1, 3, and 7 [21]. Vasoactive treatments during hospitalization in PICU were determined by the cumulative vasopressor index (CVI) [22]. We also collected incidence of secondary acquired infection, mortality (death occurring within 28 days after the onset of shock), number of mechanical ventilation-free days, and number of PICU-free days in the first 30 days. Secondary acquired infection was defined by Center for Disease Control criteria, included any new bacterial or fungal infection, distinct from initial infection, occurring more than 48 h after sepsis onset, during the first 30 days after sepsis onset [23]. Determination of secondary acquired infection was performed prospectively by one physician (SR), blinded to immunological data.

Blood sampling for immunomonitoring

Blood samples were collected within the first 48 h after the onset of infection, again between day 3–5, and day 7–9. Samples were not available if patients were no longer in PICU. Blood was collected in EDTA tubes, transported rapidly at 4 °C to the Cellular Immunology Laboratory, and analyzed within less than 4 h. The amount of blood sample did not exceed 2.4 ml/kg, in accordance with European recommendations. At each time point, the following parameters were determined by flow cytometry: mHLA-DR, total lymphocytes and lymphocytes subpopulations (CD4⁺ and CD8⁺ T cells, natural killer [NK] cells, regulatory T cells [Treg], and B cells). In addition, after completion of cellular analysis, plasma was obtained after centrifugation and stored at –80 °C for subsequent quantification of following circulating cytokines: IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, TNF- α , and IFN- γ . For the control group, blood was sampled in the operating room immediately after induction of general anesthesia with sevoflurane, before start of surgery.

Flow cytometry

Quantification of mHLA-DR on circulating monocytes was performed using a standardized flow cytometric assay as previously described [24]. The median fluorescence intensity of the entire monocyte population was then transformed to number of antibodies bound per cell (ABC) using calibrated PE beads (BD QuantiBRITE™ PE Beads, Becton–Dickinson San Jose, CA, USA). The following lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry as previously described [25, 26]: total T lymphocytes (CD45⁺ CD3⁺), CD4⁺ T lymphocytes (CD45⁺ CD4⁺ CD3⁺), CD8⁺ T lymphocytes (CD45⁺ CD8⁺ CD3⁺), total B cells (CD45⁺ CD19⁺), NK cells (CD45⁺ CD3⁺ CD56⁺), and Treg (CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻). Results were expressed as numbers of cells per microliter of blood for lymphocyte subsets and as percentage of positive cells among total CD4⁺ lymphocyte population for Treg.

Cytokine measurement

IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RA, TNF- α , and IFN- γ were quantified with a single panel (Milliplex® MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Merck Millipore) using the fluorescent bead-based multiplexed Luminex xMAP technology [27]. Analyses were performed on Bio-Plex 200 Luminex instrument using Bio-Plex software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

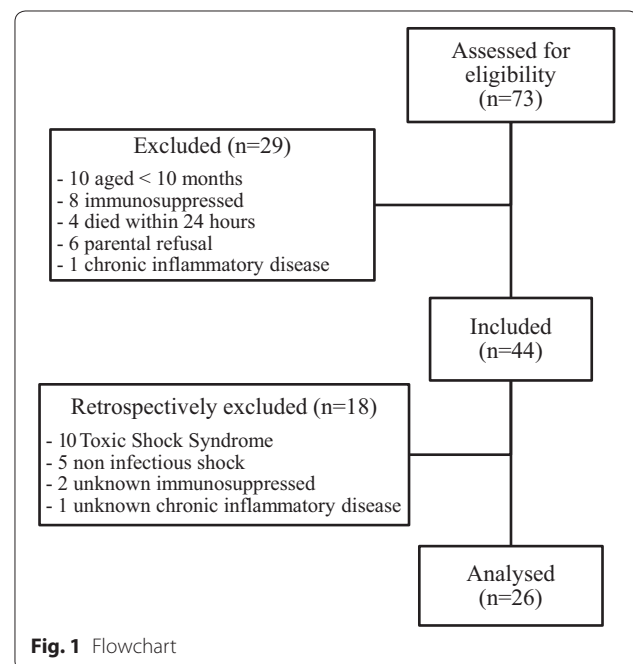
Statistical analysis

Results are expressed as median and interquartile range [IQR]. Comparisons between groups were analyzed using the Mann–Whitney *U* test for continuous nonparametric variables; the independent paired *t* test for continuous parametric variables and the Chi-square test for categorical data. Correlation analyses were performed using the Pearson test for variables following a normal distribution, and Spearman for nonparametric variables. Kaplan–Meier analyses were performed using Youden's index to stratify groups of patients. A *p* value < 0.05 was considered to represent significant statistical difference. Data were analyzed by using Prism6 software (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Subjects

Between September 2014 and July 2016, 73 children were screened for septic shock. Among these, 47 were excluded (toxic shock syndrome, non-infectious shock, known immunosuppression, or chronic inflammatory disease). A total of 26 children were included and analyzed (Fig. 1). Demographic data are presented in Table 1. Nine children (35%) presented a complex chronic condition. The most frequent was prematurity (*n*=4), but all children presented a corrected age greater than 1 month.



Others presented psychomotor delay (*n*=2), polymalformative disease (*n*=2), and sickle cell disease (*n*=1). Two children died: one precociously at day 2, due to refractory shock with multi-organ failure; and the second one at day 32, with withdrawal treatment for major brain damage after meningitis. A total of 30 healthy children were included as controls. They were age-matched with children in septic shock (*p*=0.3, Mann–Whitney): 11 were aged between 1 month and 2 years, 14 between 2 and 8 years, and 5 > 8 years.

mHLA-DR expression

In healthy control children, mHLA-DR was > 25,000 ABC; among those aged between 1 month to 2 years it was (median [IQR]) 25,477 ABC [20,478–39,143], among those aged 2–8 years it was 34,295 ABC [25,763–43,368], and among those older than 8 years it was 29,597 ABC [26,636–41,939]; there was no significant difference between age subgroups (*p*=0.35; ANOVA, Fig. 2a). There was also no correlation between age and mHLA-DR (*r*=0.018).

In children with septic shock, mHLA-DR was 6066 ABC [3737–16,310] at day 1–2, 6308 ABC [3185–8965] at day 3–5, and 9323 ABC [6384–12,738] at 7–9; at each time point values were significantly different to that found in healthy control children (*p*<0.0001; Fig. 2b). There was no correlation between mHLA-DR and PIM2 or PELOD-2 scores, at any time point, while a significant correlation was found between day 3–5 mHLA-DR and CVI (*r*=−0.50; *p*=0.031; Fig. 2c).

Table 1 Characteristics of the 26 children with septic shock included in the study

	Septic shock (n=26)
Age (years)	2.12 [0.47–4.60]
Male gender [n (%)]	11 (42)
Complex chronic conditions [n (%)]	9 (35)
Primary nosocomial infection	1 (3.9)
Site of initial infection [n (%)]	
Blood	3 (11.5)
Lung	4 (15.4)
Abdomen	8 (30.8)
Multi-site	9 (34.6)
Others	1 (3.9)
No documentation	1 (3.9)
Microbiology	
Gram-negative bacteria	
<i>Neisseria meningitidis</i>	8 (30.8)
<i>Escherichia coli</i>	3 (11.5)
<i>Klebsiella</i> species	2 (7.7)
<i>Enterobacter</i> species	2 (7.7)
<i>Campylobacter jejuni</i>	1 (3.8)
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 (3.8)
Gram-positive bacteria	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3 (11.5)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2 (7.7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (3.8)
Viruses	
Parainfluenzae virus	1 (3.8)
PIM2 admission (%)	8.1 [3.2–17.4]
PELOD-2	
Day 1	9.5 [2.75–12.0]
Day 3	4.0 [0.0–10.0]
Day 7	0.0 [0.0–5.0]
CVI	4.0 [0.0–7.0]
ICU-free days in 30 days	23.0 [19.0–26.0]
Secondary acquired infections [n (%)]	8 (30)
Mortality [n (%)]	2 (7)

Values are expressed as median [interquartile range], or a number (percentage)

PIM2 pediatric index of mortality 2, PELOD-2 PEdiatric Logistic Organ

Dysfunction score, version 2, CVI cumulative vasopressor index

Cytokines

For all cytokines, maximal elevated values were measured on early time point. Then, they presented a gradual decrease on following days but remained significantly elevated in comparison with normal values (Table 2). At day 1–2, IL-6 and IL-8 levels were significantly correlated with PELOD-2 ($r=0.52$, $p=0.012$ and $r=0.43$, $p=0.048$, respectively) and with CVI ($r=0.65$, $p=0.001$ and $r=0.51$, $p=0.015$, respectively). No correlation between initial cytokines concentrations and PIM2 score

was found. Also, there was no correlation between initial cytokines levels and mHLA-DR at day 1–2. However, IL-8, IL-10, IL-1ra and TNF- α levels at day 1–2 were significantly negatively correlated with mHLA-DR at day 3–5 ($r=-0.84$, $p<0.0001$; $r=-0.59$, $p=0.0198$; $r=-0.58$, $p=0.023$; $r=-0.69$, $p=0.0042$, respectively).

Lymphocyte subsets

Lymphocyte subsets from healthy control children are presented in Table 3. Among septic patients the total lymphocyte count was significantly lower than in healthy control children at day 1–2 and day 3–5; there was no significant difference at day 7–9 (Fig. 3a). Similar results were observed for CD4⁺ (Fig. 3b) and CD8⁺ T cell (Fig. 3c) subsets. The median total NK cell count was significantly lower as compared to healthy control children over the whole monitoring period (Fig. 3d). In contrast and, although diminished, B cells were modestly affected (Fig. 3e). The median proportion of Treg was initially similar to that found in healthy control children; this increased at day 3–5, and became significantly greater at day 7–9 (Fig. 3f). Of note, we did not find any correlation between lymphocytes subsets and CVI (data not shown).

Secondary acquired infections

A secondary acquired infection was diagnosed in eight children (Additional file 1: Tables S1 and S2). The median time to onset of these infections was 13.5 days (range: [9–25]). Compared to children who did not developed secondary acquired infection, the sole difference was a longer length of hospital stay for children who presented secondary acquired infection ($p=0.009$; Additional file 1: Table S1). Between these two groups, no difference was observed concerning duration of invasive equipment, PICU staying, complex chronic condition and severity scores. No significant difference in lymphocyte subset was observed between children with or without secondary acquired infections. No association was found between persistent lymphopenia (defined as an absolute lymphocyte count of <1000 cells/ μ l for 3 days) and development of secondary acquired infection. At day 1–2, there was no significant difference in mHLA-DR values; at day 3–5 those with secondary acquired infection had a significantly lower level of mHLA-DR (4398 ABC [2437–6212]) than those without (8474 ABC [5904–10,844], $p=0.022$; Fig. 2d). At day 1–2, children with secondary acquired infection had higher concentrations of IL-6, IL-8, and TNF- α than those without (Additional file 1: Table S1). There was no significant difference in cytokine concentrations at other time points. The area under the curve from receiver operating curve (ROC) analysis for the risk to develop a secondary acquired infection were all significantly >0.8 for these four significant parameters

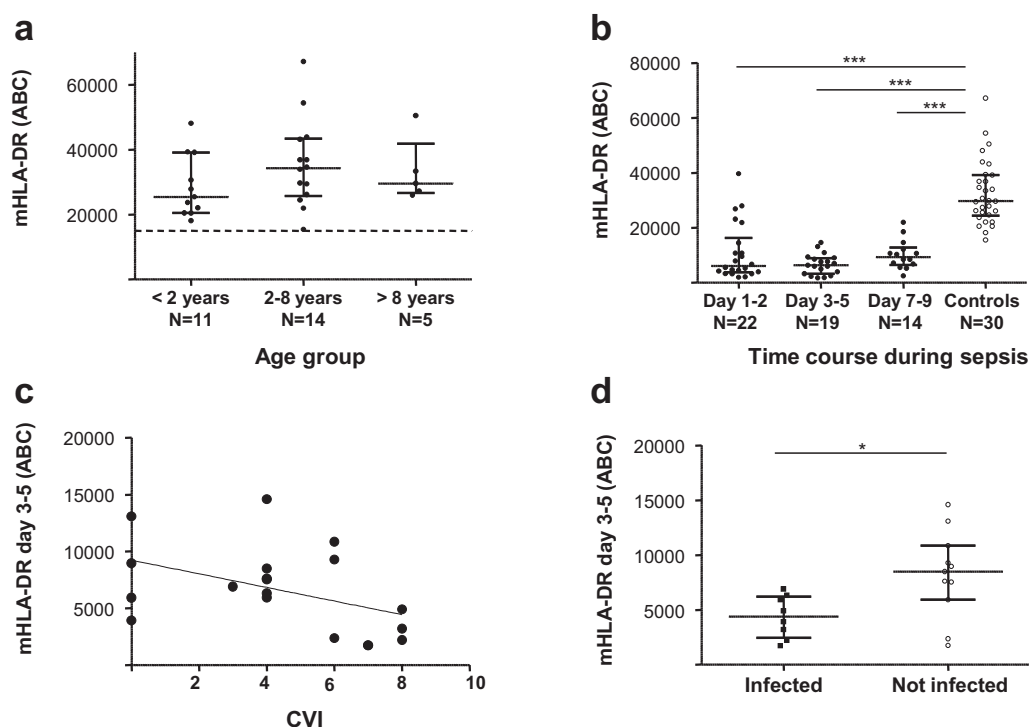


Fig. 2 mHLA-DR measurements in pediatric septic shock. **a** mHLA-DR expression in healthy children: no difference according to age groups ($p = 0.35$; ANOVA). Dashed line depicts usual threshold to define normal values in adults. **b** mHLA-DR was significantly decreased at each time point during septic shock, than controls ($p < 0.001$; Mann–Whitney). **c** mHLA-DR at day 3–5 was significantly negatively correlated with cumulative vaso-pressor index, CVI ($r = -0.50$; $p = 0.031$; Spearman). **d** mHLA-DR was significantly lower in children with secondary acquired infection than those without ($p = 0.022$; Student t test)

Table 2 Plasma cytokines levels from healthy children and children with septic shock

	Healthy controls	Children with septic shock		
		Day 1–2	Day 3–5	Day 7–9
IL-6	0.0 [0.0–0.36]	178.5 [25.77–3311]	18.13 [12.92–172.5]	17.97 [3.30–33.08]
IL-8	2.05 [0.43–5.06]	51.72 [19.07–145.7]	21.45 [11.42–56.36]	15.00 [7.98–37.98]
IL-10	0.36 [0.0–4.44]	43.37 [17.11–331.6]	8.26 [3.44–21.66]	11.83 [1.70–23.73]
IL1-RA	0.0 [0.0–17.16]	136.9 [23.72–647.8]	48.02 [0.0–153.2]	56.54 [0.0–121.3]
TNF- α	4.91 [3.35–7.11]	25.13 [14.52–40.47]	8.37 [5.34–14.62]	10.15 [4.10–15.43]
INF- γ	4.98 [1.82–6.45]	15.81 [6.55–24.22]	8.07 [2.78–11.45]	10.92 [4.65–23.70]

Values (pg/ml) are expressed as median [IQR]. All cytokine values in children with septic shock at all-time points were different from those of healthy controls

(mHLA-DR at day 3–5, and IL-6, IL-8 and TNF- α at day 1–2, Additional file 1: Table S3). In line with this, mHLA-DR at day 3–5 was negatively correlated with cytokines (except IFN- γ). Owing to the sample size, no multivariate regression could be performed to test independence between mHLA-DR and cytokines for the prediction of risk of secondary acquired infection occurrence.

We next performed Kaplan–Meier analyses associating mHLA-DR values and each cytokine level separately, which found that children with lowest values of mHLA-DR and highest cytokine levels were significantly more likely to be infected. Those with mHLA-DR above the threshold remained uninfected, independently of cytokine level (Additional file 1: Fig. S1).

Table 3 mHLA-DR and lymphocytes subsets depending on age in healthy and septic children

	0–2 years			2–8 years		> 8 years	
	Healthy (n = 11)	Septic (n = 11)		Healthy (n = 14)	Septic (n = 6)	Healthy (n = 5)	Septic (n = 2)
mHLA-DR (ABC)	25,477 [20,478–39,143]	6302 [2187–9278]		34,295 [25,763–43,368]	5913 [2977–8911]	29,597 [26,636–41,939]	7927 [6888–8965]
Total lymphocytes (absolute count; cells/ μ l)	5934 [4148–8572]	2736 [1962–3550]		3623 [2940–4358]	1680 [897–2453]	2374 [1831–3298]	1047 [403–1691]
CD4 ⁺ T cells (absolute count; cells/ μ l)	2187 [1566–2738]	1186 [939–1640]		1184 [968–1583]	574 [236–478]	895 [682–1100]	332 [187–478]
CD8 ⁺ T cells (absolute count; cells/ μ l)	1033 [910–1380]	487 [311–591]		758 [631–1264]	365 [155–608]	689 [467–924]	161 [51–270]
NK cells (absolute count; cells/ μ l)	645 [392–753]	58 [25–124]		424 [295–576]	96 [35–156]	315 [191–645]	60 [4–117]
B cells (absolute count; cells/ μ l)	1811 [1326–2750]	901 [648–1397]		729 [563–988]	622 [288–791]	352 [273–508]	422 [150–693]
Regulatory T cells (% among CD4 ⁺)	7.67 [5.39–8.24]	7.72 [5.1–9.0]		6.29 [5.29–8.31]	8.83 [7.1–10.3]	6.80 [6.10–8.48]	7.9 [5.8–10.1]

Values are expressed as median [IQR] according to age group. Septic children values were obtained at day 3

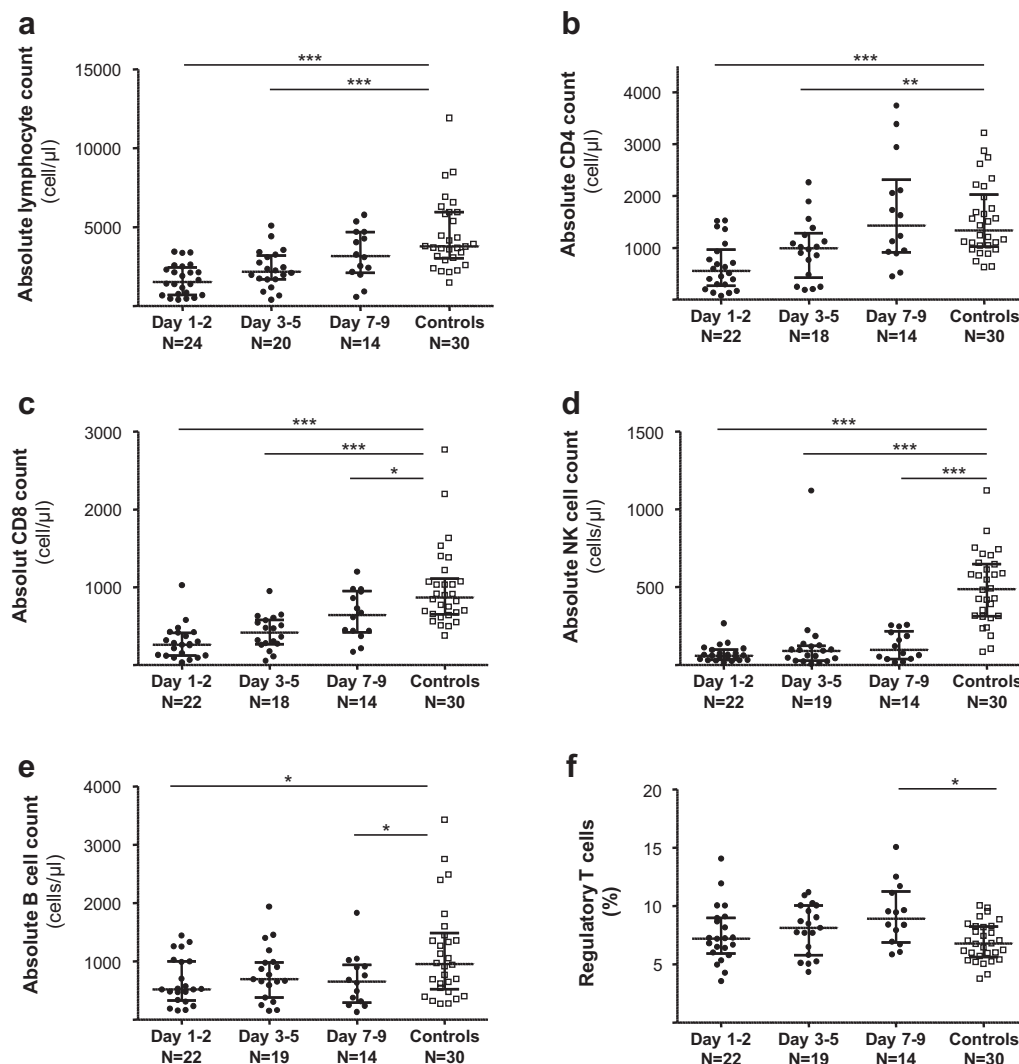


Fig. 3 Time course of lymphocytes' subsets during septic shock. **a** Total lymphocytes, **b** CD4⁺ T cells, **c** CD8⁺ T cells, **d** NK cells, **e** B cells (from **a** to **e**, results as cell number/μl), **f** proportion of regulatory T cells (among CD4⁺ lymphocytes). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$

Discussion

The present investigation is, to the best of our knowledge, the first prospective pediatric study reporting a wide immune monitoring, specifically in septic shock. However, the first important result of this study is the values of mHLA-DR expression in healthy children. There was no variation according to age (between 6 months and 17 years) and, furthermore, the values are not different to those reported in adults [28]. These results strongly suggest that there is no difference between healthy adults and children in terms of mHLA-DR expression. Important fall in mHLA-DR during pediatric septic shock seems to be similar to those observed during adult septic shock.

The cytokine storm reported herein, involving both pro and anti-inflammatory cytokines, was found in the initial period after shock (day 1–2). At the same time, children who later developed a secondary acquired infection had higher plasma cytokine concentrations (i.e., IL-6, IL-8, and TNF- α). This is in agreement with observations from genomic studies that have found that early mRNA expression modulations of cytokines and apoptotic genes were associated with deleterious outcomes (mortality, secondary infections) [29, 30]. Moreover, to the best of our knowledge, this is the first pediatric study which reported correlation between initial cytokine storm and alteration of innate immunity, represented by loss of mHLA-DR.

Concerning adaptive immunity, B and T lymphocytes were diminished initially, but less impacted and corrected faster than mHLA-DR alteration. The modest diminution of B cells constitutes a difference with that found in adults, for instance Monserrat et al. [31] described severe abnormality of circulating B lymphocytes associated with mortality. Concerning NK cells, Halstead et al. [32] observed a decrease at the beginning of sepsis in children. The present study provides supplementary data since a deep and prolonged alteration of circulating NK cells was found. Although we did not explore this side, NK cell alterations could promote infections by opportunistic viral pathogens [33]. In contrast with the study reported by Muszynski et al. [14], an increase in Treg proportion during the first week was observed herein. This kinetic seems similar to that described in adult septic shock, where an increased proportion of Treg was associated with poor outcome [34]. Here, as for other lymphocyte parameters, no association with nosocomial infections was found. Additional functional testing (proliferation, intracellular cytokine production) would be likely informative and deserves to be further investigated. At this stage, the present lymphocyte data seem to indicate that altered lymphocyte count rapidly self-resolves, in contrast with observations made in adults.

With regards to innate immunity, loss of mHLA-DR has emerged as a gold standard biomarker owing to its association with altered monocyte functionality, increased mortality, and nosocomial infection rate after adult septic shock [6, 35]. In accordance, we report here a significant fall in mHLA-DR in children. Importantly, the lowest values at day 3–5 were found in patients who developed secondary acquired infections. At this time point, all patients with forthcoming infections presented mHLA-DR below 8000 ABC (i.e., the usual threshold for defining the most severely immunosuppressed adult patients [36]). Most pediatric studies have used ex vivo LPS-induced TNF- α production by monocytes to assess innate immunity function. However, Drewry et al. [35] presented recently mHLA-DR as a better predictor of deleterious outcomes than LPS-stimulated TNF- α production. Add to our results, these data reinforced the idea to use mHLA-DR as biomarker of altered innate immunity in pediatric studies. Due to low number of deaths in the present cohort, we did not investigate the potential association with mortality. Although not all obtained using a standardized measurement protocol, the pediatric mHLA-DR data available in the literature are in agreement with that reported herein. For example, Manzoli et al. [13] found the extent of mHLA-DR level reduction during the first week after sepsis onset to be associated with mortality (23% mortality), and Genel et al. [16] also reported lower levels of mHLA-DR among

infected neonates who did not survive compared to those who did (20% mortality). Decreased mHLA-DR has also been described in pediatric surgery and was associated with later sepsis and pneumonia [37, 38]. In addition, Hall et al. [11] reported that, in children with multiple organ dysfunction syndrome, persistent decreased TNF- α release (that reflects monocyte functionality) over 5 days was associated with development of secondary infection. In addition, some in vitro and animal studies suggest potential role of norepinephrine in the development of sepsis-induced immunosuppression [39]. These data reinforced our significant correlation between day 3–5 mHLA-DR and CVI.

Collectively, this indicates that, as in adults, mHLA-DR presents potential for the identification of the most severe immunosuppressed children. The next step would, of course, be to perform multivariate analysis in a larger patient sample to explore the independence of each parameter in predicting deleterious outcomes. That given, Kaplan–Meier analyses found that although different markers (i.e., day 3–5 mHLA-DR and early elevated cytokines) were associated with secondary acquired infections, the weight of mHLA-DR was more important. Interestingly, as observed in adult trauma patients, association between early cytokines production and low day 3–5 mHLA-DR appeared as the poorest scenario in pediatric septic shock [40].

Furthermore, secondary acquired infections represent a major economic burden by significantly extending length of hospital stay [41, 42], and concordantly herein the length of hospitalization in those with secondary infection doubled (and this difference was significant). Taken together, these data reinforce the idea that most immunosuppressed septic children might benefit from immunostimulation as an adjunctive therapy [43]. Clinical trials are in progress with GM-CSF (NCT02361528) or IL-7 (NCT02640807/NCT02797431) in adults, and standardized tools are currently used to stratify patients in those trials. This progressively paves the way for this kind of approach in pediatrics, especially for innate immunity that seems to be more affected.

The study does, however, have some limitations. First, the relatively small number of included children precluded multivariate analyses to be performed. Second, some children were discharged from PICU before all samples were obtained, and therefore the time course of different immune parameters in less severe children was not determined. Due to the relatively short follow-up period, we cannot conclude on the long-term outcome of these children treated for septic shock. In addition, functional testing should be performed in next studies. These aspects need to be further explored, and ideally in a multicenter study.

Conclusion

As in adults, septic shock in pediatric patients induced marked alterations in immune parameters in accordance with the occurrence of a state of immunosuppression. The present results, in particular the association between low mHLA-DR expression and deleterious outcomes, deserves to be assessed and confirmed in multicenter studies.

Additional file

Additional file 1. Online data supplement.

Abbreviations

ABC: antibodies bound per cell; CVI: cumulative vasopressor index; IFN- γ : interferon- γ ; IL-1Ra: interleukine-1 receptor antagonist; IL-6: interleukine-6; IL-8: interleukine-8; IL-10: interleukine-10; mHLA-DR: monocyte human leukocyte antigen-DR; NK cells: natural killer cells; PELOD-2: PEdiatric Logistic Organ Dysfunction Score, version 2; PICU: pediatric intensive care unit; PIM2: pediatric index of mortality 2; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; Treg: regulatory T cells.

Authors' contribution

EJ and GM conceptualized and designed the study, and reviewed and revised each draft of the manuscript. SR collected clinical data, performed biological analysis, designed and conducted the statistical analysis, drafted the initial manuscript and reviewed and revised the manuscript. KK-D collected clinical data, reviewed and revised the manuscript. JD, MG and FV performed biological analysis, participated in statistical analysis, and reviewed and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Hospices Civils de Lyon, Paediatric Intensive Care Unit, Mother and Children University Hospital, 59 Boulevard Pinel, 69500 Bron, France. ² Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, E. Herriot Hospital, 69003 Lyon, France. ³ EA 7426, Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression, University Claude Bernard Lyon 1, BioMérieux Hospices Civils de Lyon, E. Herriot Hospital, 69003 Lyon, France.

Acknowledgements

The authors acknowledge technical staff from Cellular Immunology Laboratory for realization of biological analysis. The authors also thank the Clinical Investigation Center, EPICIME – Lyon, for help in study's organization.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

According to the French National Data Protection Commission, we are not authorized to provide the data.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by our Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes, Lyon Sud-Est II, number 2014-010-2, in accordance with Article L1121-1 of the French Public Health Code). According to legislation in place at the time of the study, this study required only the non-opposition of the study participants (written informed consent was not required). An information leaflet was systematically distributed to holders of parental authority. Participants and/or holders of parental authority could withdraw consent at any time. The study was registered: Pediatric Immune Response to Infectious Shock (PedIRIS). NCT02848144. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02848144?term=pediris&rank=1>.

Funding

This study was supported by Hospices Civils de Lyon and University of Lyon. In addition, it was also funded by a research grant from the French Intensive Care Society (Société de Réanimation de Langue Française, SRLF) awarded to KKD.

The sponsors of the study had no role in study design, data collection, analysis and interpretation, or writing of the report.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 14 December 2017 Accepted: 3 March 2018

Published online: 13 March 2018

References

- Schlapbach LJ, Straney L, Alexander J, MacLaren G, Festa M, Schibler A, et al. Mortality related to invasive infections, sepsis, and septic shock in critically ill children in Australia and New Zealand, 2002–13: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(1):46–54.
- Bilgin K, Yaramiş A, Haspolat K, Taş MA, Günbey S, Derman O. A randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonates with sepsis and neutropenia. *Pediatrics*. 2001;107(1):36–41.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(3):260–8.
- Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(4):477–83.
- Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohé J, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med*. 2010;36(11):1859–66.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard A-L, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006;32(8):1175–83.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(12):862–74.
- Hotchkiss RS, Moldawer LL. Parallels between cancer and infectious disease. *N Engl J Med*. 2014;371(4):380–3.
- Delano MJ, Ward PA. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev*. 2016;274(1):330–53.
- Meisel C, Scheffold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(7):640–8.
- Hall MW, Knatz NL, Vetterly C, Tomarello S, Wewers MD, Volk HD, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 2011;37(3):525–32.
- Muszynski JA, Nofziger R, Greathouse K, Nateri J, Hanson-Huber L, Steele L, et al. Innate immune function predicts the development of nosocomial infection in critically injured children. *Shock (Augusta Ga.)*. 2014;42(4):313–21.
- Manzoli TF, Troster EJ, Ferranti JF, Sales MM. Prolonged suppression of monocytic human leukocyte antigen-DR expression correlates with mortality in pediatric septic patients in a pediatric tertiary Intensive Care Unit. *J Crit Care*. 2016;33:84–9.
- Muszynski JA, Nofziger R, Greathouse K, Steele L, Hanson-Huber L, Nateri J, et al. Early adaptive immune suppression in children with septic shock: a prospective observational study. *Crit Care Lond Engl*. 2014;18(4):R145.
- Wisgrill L, Groschopf A, Herndl E, Sadeghi K, Spittler A, Berger A, et al. Reduced TNF- α response in preterm neonates is associated with impaired nonclassical monocyte function. *J Leukoc Biol*. 2016;100(3):607–12.
- Genel F, Atlihan F, Ozsu E, Ozbek E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J Infect*. 2010;60(3):224–8.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 2013;39(2):165–228.

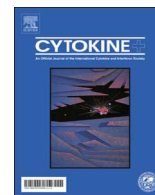
18. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc*. 2005;6(1):2–8.
19. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the pediatric AIDS clinical trials group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(5):973–80.
20. Slater A, Shann F, Pearson G, Paediatric Index of Mortality (PIM) Study Group. PIM2: a revised version of the Paediatric Index of Mortality. *Intensive Care Med*. 2003;29(2):278–85.
21. Leteurtre S, Duhamel A, Deken V, Lacroix J, Leclerc F, Groupe Francophone de Réanimation et Urgences Pédiatriques. Daily estimation of the severity of organ dysfunctions in critically ill children by using the PELOD-2 score. *Crit Care Lond Engl*. 2015;19:324.
22. Trzeciak S, McCoy JV, Phillip Dellinger R, Arnold RC, Rizzuto M, Abate NL, et al. Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis. *Intensive Care Med*. 2008;34(12):2210–7.
23. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008;36(5):309–32.
24. Demaret J, Walencik A, Jacob M-C, Timsit J-F, Venet F, Lepape A, et al. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(1):59–62.
25. Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis M-A, Darbon R, et al. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock (Augusta Ga.)*. 2010;34(4):358–63.
26. Saison J, Maucourt-Boulch D, Chidiac C, Demaret J, Malcus C, Cotte L, et al. Increased regulatory T-cell percentage contributes to poor CD4(+) lymphocytes recovery: a 2-year prospective study after introduction of antiretroviral therapy. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2(2):ofv063.
27. de Jager W, te Velthuis H, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(1):133–9.
28. Döcke W-D, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem*. 2005;51(12):2341–7.
29. Wong HR, Cvijanovich N, Wheeler DS, Bigham MT, Monaco M, Odoms K, et al. Interleukin-8 as a stratification tool for interventional trials involving pediatric septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(3):276–82.
30. Peronnet E, Nguyen K, Cerrato E, Guhadasan R, Venet F, Textoris J, et al. Evaluation of mRNA biomarkers to identify risk of hospital acquired infections in children admitted to paediatric intensive care unit. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0152388.
31. Monserrat J, de Pablo R, Diaz-Martin D, Rodríguez-Zapata M, de la Hera A, Prieto A, et al. Early alterations of B cells in patients with septic shock. *Crit Care Lond Engl*. 2013;17(3):R105.
32. Halstead ES, Carcillo JA, Schilling B, Greiner RJ, Whiteside TL. Reduced frequency of CD56 dim CD16 pos natural killer cells in pediatric systemic inflammatory response syndrome/sepsis patients. *Pediatr Res*. 2013;74(4):427–32.
33. von Muller L, Klemm A, Durmus N, Weiss M, Suger-Wiedeck H, Schneider M, et al. Cellular immunity and active human cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J Infect Dis*. 2007;196(9):1288–95.
34. Monneret G, Debard A-L, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, et al. Marked elevation of human circulating CD4 + CD25 + regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med*. 2003;31(7):2068–71.
35. Drewry AM, Ablordepey EA, Murray ET, Beiter ER, Walton AH, Hall MW, et al. 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*. 2016;20(1):334.
36. Bo L, Wang F, Zhu J, Li J, Deng X. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit Care Lond Engl*. 2011;15(1):R58.
37. Gessler P, Pretre R, Bürki C, Rousson V, Frey B, Nadal D. Monocyte function-associated antigen expression during and after pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130(1):54–60.
38. Hoffman JA, Weinberg KI, Azen CG, Horn MV, Dukes L, Starnes VA, et al. Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral blood monocytes and the risk of pneumonia in pediatric lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2004;6(4):147–55.
39. Stolk RF, van der Poll T, Angus DC, van der Hoeven JG, Pickkers P, Kox M. Potentially inadvertent immunomodulation: norepinephrine use in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(5):550–8.
40. Gouel-Chéron A, Allaouchiche B, Guignant C, Davin F, Floccard B, Monneret G, et al. Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33095.
41. Field-Ridley A, Dharmar M, Steinhorn D, McDonald C, Marcin JP. ICU-acquired weakness is associated with differences in clinical outcomes in critically ill children. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc*. 2016;17(1):53–7.
42. Carcillo JA, Dean JM, Holubkov R, Berger J, Meert KL, Anand KJS, et al. Inherent risk factors for nosocomial infection in the long stay critically ill child without known baseline immunocompromise: a post hoc analysis of the crisis trial. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(11):1182–6.
43. Pfortmueller CA, Meisel C, Fux M, Scheffold JC. Assessment of immune organ dysfunction in critical illness: utility of innate immune response markers. *Intensive Care Med Exp*. 2017;5(1):49.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

ANNEXE 6



Decreased intra-lymphocyte cytokines measurement in septic shock patients: A proof of concept study in whole blood

Wilfried Letessier^a, Julie Demaret^{b,c}, Morgane Gossez^{b,c}, Camille Allam^{b,c}, Fabienne Venet^{b,c}, Thomas Rimmelé^{c,d}, Guillaume Monneret^{b,c,*}

^a École du Val-De-Grâce, Service de Santé des Armées, Paris 75005, France

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

^c EA 7426 "Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression (Université Claude Bernard Lyon 1-Hospices Civils de Lyon – BioMérieux), Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

^d Hospices Civils de Lyon, Anesthesia and Critical Care Medicine Department, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Sepsis
Flow cytometry
T lymphocyte
Intracellular cytokine
Septic shock

ABSTRACT

Functional testing protocols are thought to be the gold standard for the exploration of the immune system. However, in terms of routine analysis, they present numerous drawbacks and consequently their use is mainly limited to research applications. In the clinical context of septic shock, characterized by marked lymphocyte alterations, a new approach for lymphocyte intracellular cytokine measurement in whole blood upon was evaluated in a proof-of-concept study. Following lymphocyte activation, simultaneous intracellular labeling of Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), and Interleukin-2 (IL-2) was performed in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (identified by surface marking). The analysis was carried out by flow cytometry (6 colors). Results obtained in septic patients ($n = 22$) were compared to those of healthy volunteers ($n = 8$). Independently of lymphopenia, there were significant differences between groups. In particular there was significant decrease in the production of IL-2 and TNF- α in septic patients, while the production of IFN- γ was not significantly altered. Polyfunctional results showed that patients presented with increased percentages of triple negative lymphocytes. In contrast, volunteers had higher proportions of triple positive cells. The approach could be performed in a robust and consistent way, taking 4.5 h to complete. Moreover, clear differences could be observed between clinical groups with this modified method. These characteristics illustrate the potential of this novel whole blood protocol for clinical applications. However, further research is required to determine the applicability compared to alternative test and to evaluate clinical performances in larger cohorts of patients.

1. Introduction

In clinical immunology laboratories, functional testing remains the gold standard because it directly measures the capacity of a cell population to respond to an immune challenge [1,2]. However, although providing excellent insights regarding pathophysiology, this approach remains barely usable for routine clinical monitoring due to several drawbacks (e.g., long incubation time, lengthy cell purification procedures, cell permeabilization, several staining steps, and numerous wash cycles). As a consequence, these protocols remain difficult to be standardized and thus they do not easily fulfil criteria for certification and accreditation of clinical laboratories [3]. Thus, a major challenge is therefore to bring functional testing to routine clinical practice.

Among immune functional assays, measurement of intracellular cytokines by flow cytometry appears as one of the most helpful [4]. It is able to

determine both cell functionality and phenotype, while enumerating them. For instance, it is frequently used to characterize immune responses to infectious diseases, assess pyrogenicity of solutions, and measure immunogenicity during clinical trials of vaccines [4–6]. However, this assay remains time-consuming (about 6–8 h for completion, including several technical steps) and is consequently not used in clinical monitoring except for rare conditions (e.g., immune deficiencies, [1,7]).

We recently reported a novel approach to intracellular staining for flow cytometry that uses whole blood, and which is both rapid and robust [7]. Based on a similar approach, the aim herein was to assess simultaneous measurement of TNF- α , IFN- γ , and IL-2 in CD4 and CD8 T cells in clinical samples. This proof of concept study was performed in the clinical context of septic shock in which T cells are believed to have an exhausted phenotype characterized by decreased cytokine production capacity [8].

* Corresponding author at: Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5 places d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France.
E-mail address: guillaume.monneret@chu-lyon.fr (G. Monneret).

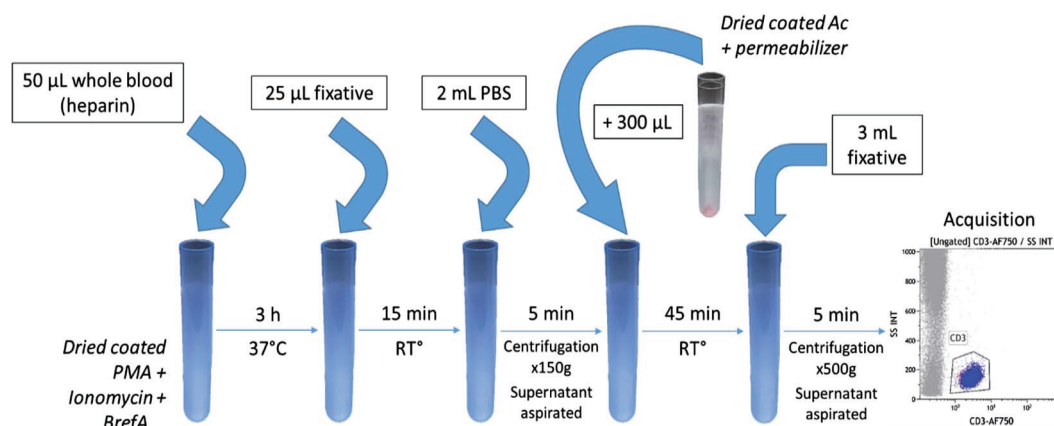


Fig. 1. Schematic representation of the staining procedure.

2. Materials and methods

2.1. Study population

Twenty-two septic shock patients (according to the diagnostic criteria of the International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock [9]) admitted to the surgical ICU of E. Herriot Hospital (Lyon University hospitals) were enrolled in the study. This work is part of a comprehensive study of immune dysfunctions induced in ICUs (NCT02803346) which has been submitted to an ethics committee and approved by the institutional review board and registered with the French Ministry of Higher Education and Research (#DC-2008-509). Blood was collected in heparin coated tubes. Clinical and biological data were collected during the follow-up period (until 28 days)

2.2. Research reagents

Tubes (12 × 75 mm) containing a dry coating of a mixture of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) and Ionomycin to stimulate the production of cytokines by T cells, and Brefeldin A (BrefA) to block cytokine secretion via the Golgi apparatus. In addition, tubes (12 × 75 mm) containing a dry coating of conjugated antibodies formulated for this assay were also used: Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-labeled anti-IFN γ (clone 45.15), Phycoerythrin (PE)-labeled anti-TNF- α (clone IPM2), PE-Cyanine 7 (PC7)-labeled anti-IL-2 (clone MQ1-17H12), Alexa Fluor 700 (A700)-labeled anti-CD8 (clone B9.11), Alexa Fluor 750 (A750)-labeled anti-CD3 (UCHT1) and Pacific Blue (PB)-labeled anti-CD4 (13B8.2). These reagents are custom-made, optimized for this study by Beckman Coulter Immunotech (Marseille, France).

2.3. Intracellular staining procedure

A schematic protocol representation is presented in Fig. 1. Briefly, 50 microliters of undiluted fresh whole blood (< 2 h after sampling) was directly added to the stimulation tube (PMA-Ionomycin-BrefA), or to an empty control tube, and incubated 3 h at 37 °C. Samples were then treated according to the regular PERFIX-no centrifuge (nc) procedure (Beckman Coulter, Brea, CA, US). Briefly, 25 μ L of PERFIX-nc fixative reagent was added and the sample incubated for 15 min at room temperature in the dark, 2 mL PBS was then added and the tubes centrifuged at 150g for 5 min at 10 °C, the supernatant was aspirated, and 25 μ L of FBS were added to the pellet. Samples were then concomitantly permeabilized and stained for 45 min at room temperature in the dark (dried antibodies were resuspended extemporaneously with

300 μ L permeabilizing reagent). The cells were then washed with 3 mL PERFIX-nc final reagent. The pellet was finally resuspended by adding 500 μ L of PERFIX-nc final reagent. The entire protocol needed approximately 4.5 h to be completed.

2.4. Flow cytometry data acquisition and analysis

Data acquisition was performed on a Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter). Our instrument was daily calibrated with Flow-check Pro Fluorospheres (Beckman Coulter) to control optical alignment and fluidic system and Sphero Rainbow Calibration (8 peaks) beads (Spherotech, IL, USA) to ensure MFI stability overtime. T cells were first gated out from other cells on the basis of labelling with CD3. Within the CD3⁺ T cell population, CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were identified based on CD4/SSC and CD8/SSC dot-plots. Illustrative gating strategy is shown in Fig. 2. Intracellular TNF- α , IFN- γ , and IL-2 expressions were then measured on CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulations. All results were expressed either as percentages of cytokine-positive T cells (% positive cells) among the total CD4⁺ or CD8⁺ T cell subpopulations (positivity threshold was defined based on non-stimulated values from healthy donors and set up at first decade), or as MFI of the entire T cell subpopulation (Fig. 2C). Polyfunctional analysis was performed with tree function of Kaluza software (Beckman Coulter).

2.5. Statistical analysis

Results (% positive cells and MFI) were expressed as individual values and medians $\pm$ IQR (interquartile range). Results for the three cytokines (TNF- α , IFN- γ , and IL-2) in both T cell subpopulations (CD4⁺ and CD8⁺) with or without PMA-Ionomycin challenge among healthy volunteers and septic shock patients were compared, using the non-parametric Mann-Whitney *U* test or Wilcoxon paired test. Correlations were investigated using the Spearman correlation test. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism® software (version 5.0; GraphPad Software, La Jolla, CA, US). A *p*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Patients and healthy volunteers

Twenty-two septic shock patients (sampled during first 48 h after diagnosis) and eight healthy controls were included. Five patients were sampled a second time at D3-4. At onset of shock, the median

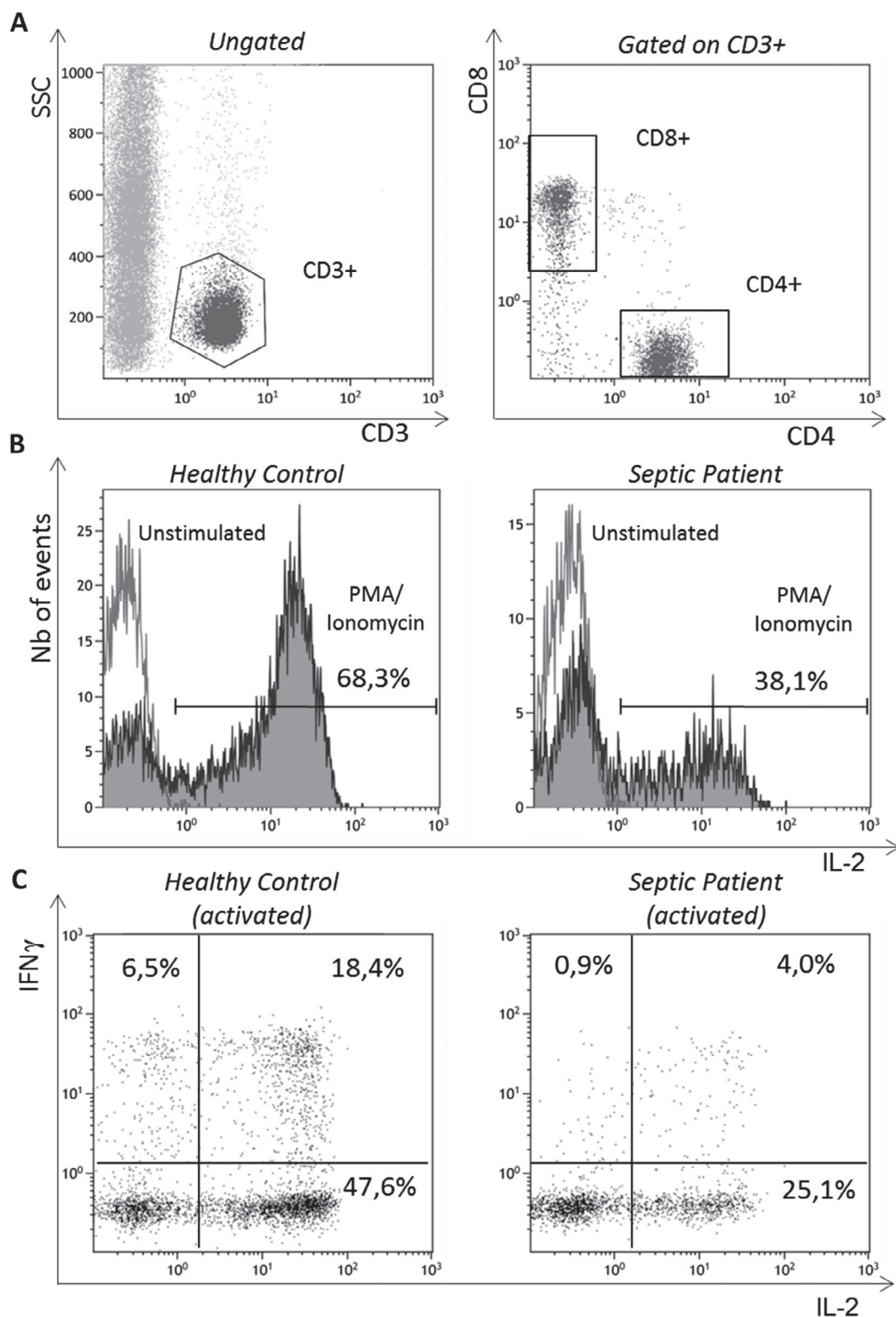


Fig. 2. Gating strategy and illustrative examples of intracellular cytokine production measurement in T-cells subsets. (A) CD3⁺ lymphocytes were identified based on side-scattered (SSC) versus CD3 expression on a biparametric histogram (left). CD4⁺ and CD8⁺ were identified among selected CD3⁺ cells (right). (B) Overlay representation of CD4⁺ intracellular IL-2 measurement in non-stimulated conditions (white) or after a 3 h-stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and Ionomycin (grey) in a Healthy Control (left) or a Septic Patient (right). (C) Biparametric histograms, representing IL-2 and IFN γ production, in CD4⁺ after stimulation, in a Healthy Control (left) or a Septic Patient (right).

[Interquartile range, IQR] age was 74 years [68–83], Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II was 59 [IQR 47.5–74], and the Sequential Organ Failure Assessment score was 8 [IQR 7–11.5]. Seven patients (32%) died within 28 days and secondary nosocomial infections were

diagnosed in 4 patients (18%). At D3-4, septic shock patients presented with usual characteristics of injury-induced immunosuppression with a reduced mHLA-DR expression and low CD4⁺ lymphocytes count in comparison with normal values (Table 1). Healthy volunteers (4

Table 1
Clinical and immunological data for patients with septic shock.

	Septic cohort n = 22
Age at admission (years)	74 [68–83]
Gender – Male, n (%)	11 (50)
<i>Main admission category</i>	
Medical	10 (45)
Surgery	12 (55)
SAPS II at the time of shock diagnosis	59 [47.5–74]
SOFA at the time of shock diagnosis	8 [7–11.5]
<i>Comorbidities</i>	
0, n (%)	4 (18)
≥ 1, n (%)	18 (82)
28-day mortality (%)	32
Secondary nosocomial infection (%)	18
<i>Immunological parameter (day 3–4)</i>	
mHLA-DR (ABC)	4529 [3377–8005]
CD4 ⁺ (cells/ μ L)	400 [293–525]

Numeric variables are presented as median and IQR (quartile 1 to quartile 3). Categorical variables are presented as number of cases, and percentages among the total of patients in parentheses. SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II, calculated at the patient inclusion. SOFA: Sequential Organ Failure Assessment, measured after 24 h of ICU stay. mHLA-DR: monocyte HLA-DR expression (ABC: antibodies bound per cell, normal values > 15,000), CD4⁺: absolute value of CD4T cells (normal values: 500–1250) – measured at days 3–4 after septic shock onset.

women/4 men, from 48 to 60 years old) all presented with normal values regarding mHLA-DR (median: 18,500 ABC) or CD4⁺ lymphocyte count (median: 798 cells/ μ L).

3.2. Intracellular cytokines

At D1-2 expression of TNF- α , IFN- γ , and IL-2 in both T cell sub-populations was statistically higher following PMA-Ionomycin challenge compared to non-stimulated control, either in healthy subjects or patients ($p < 0.0001$). This was observed when results were expressed either as a proportion of positive cells (Fig. 3) or MFI (Fig. 4). The proportion of CD4T cells expressing TNF- α ($p = 0.0002$) and IL-2 ($p = 0.0007$) as well as the proportion of CD8⁺ T cells expressing IL-2 ($p = 0.0011$) after stimulation were significantly lower among septic shock patients than healthy volunteers (Fig. 3). Similarly, significant differences were found following PMA-Ionomycin stimulation between patients and healthy volunteers for TNF- α and IL-2 MFI of both CD4⁺ ($p = 0.0106$, and $p = 0.0121$, respectively) and CD8⁺ T cells, ($p = 0.0157$ and $p = 0.0053$, respectively). No significant difference was observed in the kinetic study between patients sampled both at D1-2 and D3-4 (data not shown). Polyfunctional results (from tree analysis, Fig. 5A) are exhaustively presented in Table 2. Illustrative examples are provided in Fig. 5B. For instance, septic patients presented with increased percentages of triple negative CD4⁺ T cells ($p: 0.0001$). In contrast, volunteers had more cells simultaneously positive for the 3 measured cytokines both in CD4⁺ T cells ($p: 0.009$) and CD8⁺ T cells ($p: 0.003$). We did not find any association between polyfunctional results and mortality. Of note, as controls are slightly younger than patients, the potential effect of age should be ruled out in further study.

3.3. Correlations

We did not find any significant correlations between CD4 and CD8 T cell counts and intracellular cytokine expressions (% positive cells and MFI). There was only one significant correlation (IL-2 production and CD8 T cell

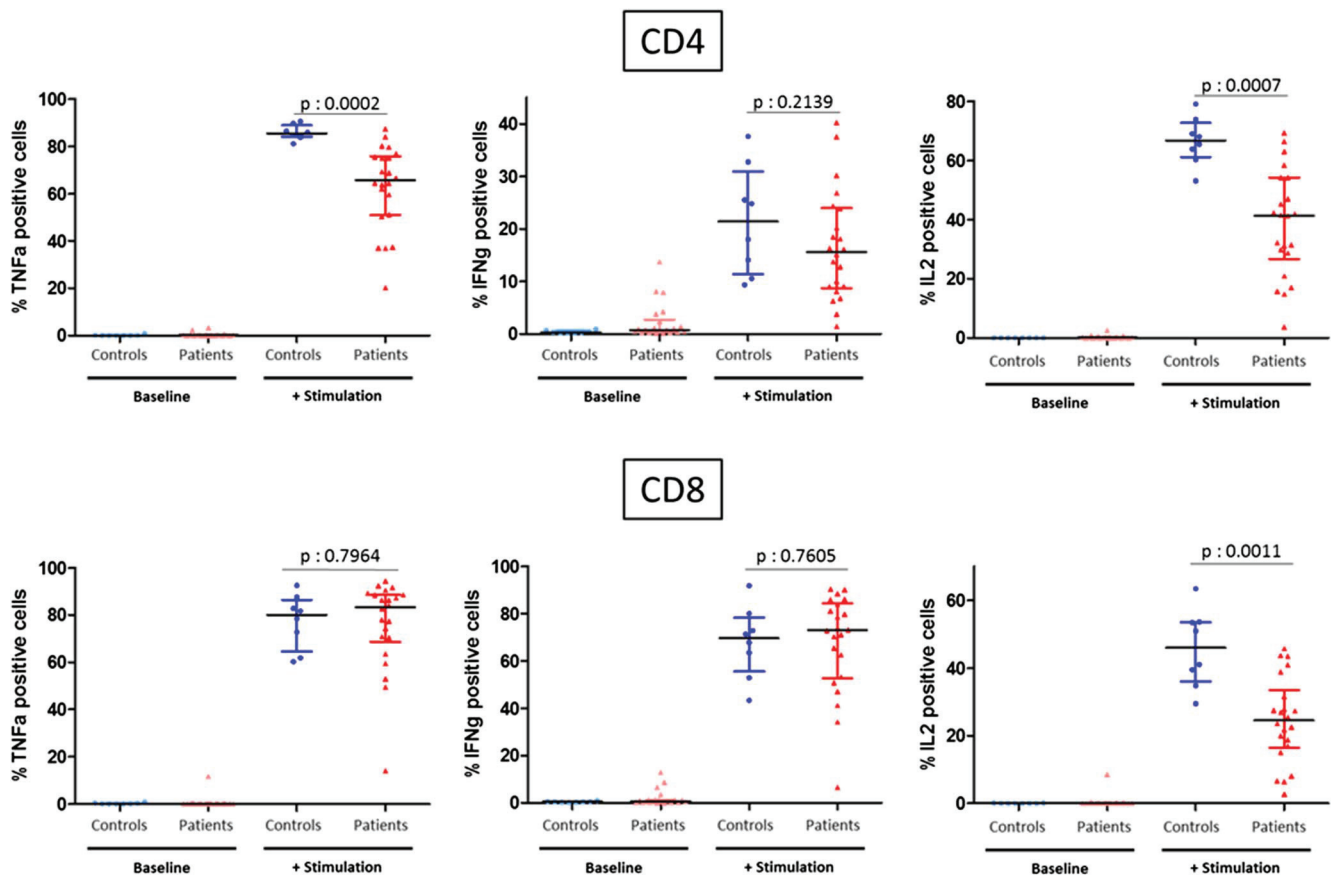


Fig. 3. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes expressing TNF- α , IFN- γ , and IL-2 (as% of positive cells) in healthy volunteers (n = 8) and septic shock patients (n = 22, days 1–2). Results are represented as individualized points along with the median and IQR.

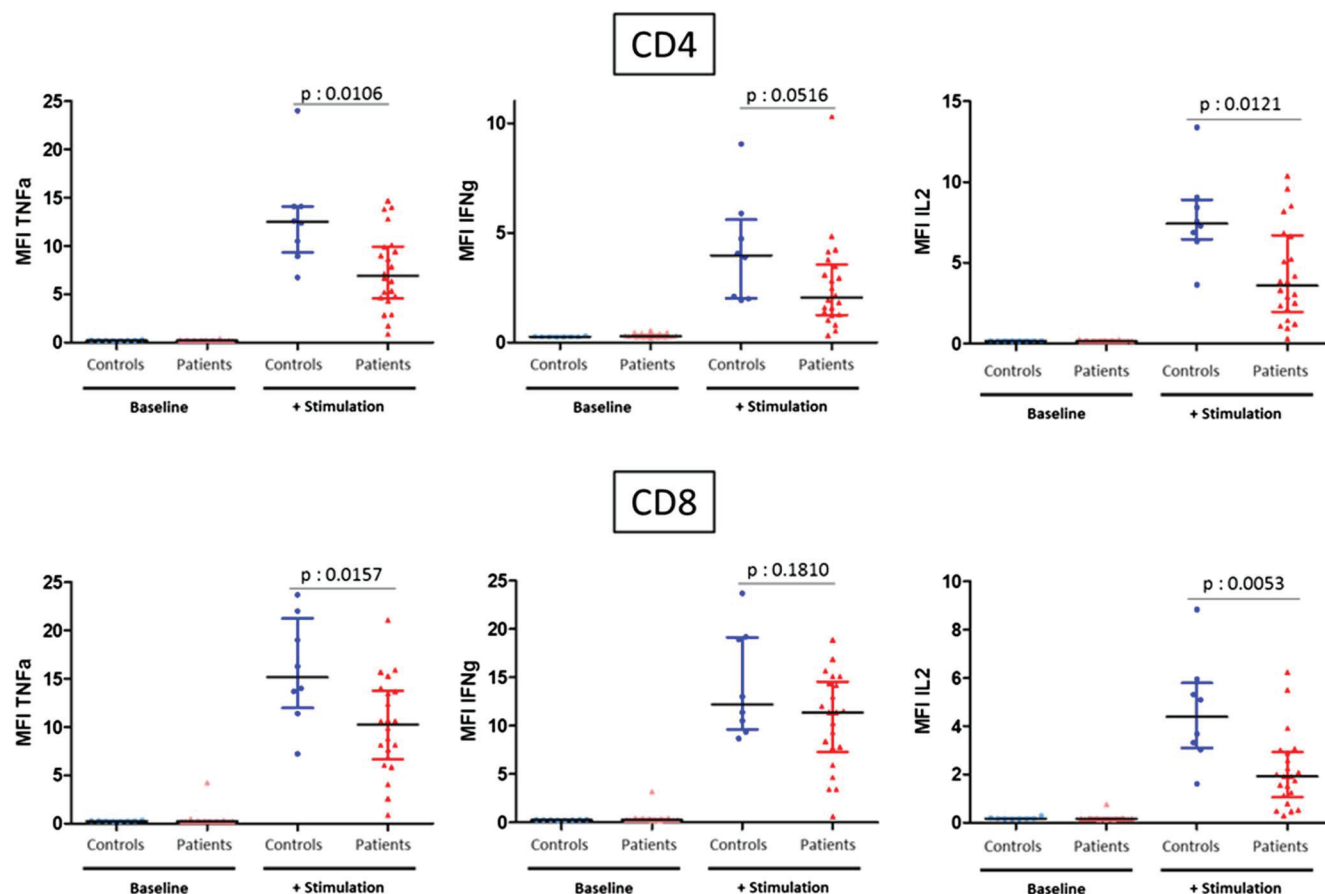


Fig. 4. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes expressing TNF- α , IFN- γ and IL-2 (as mean of fluorescence intensities) in healthy volunteers ($n = 8$) and septic shock patients ($n = 22$, days 1–2). Results are represented as individualized points along with the median and IQR.

count) and it was negative ($r = -0.46$, $p = 0.034$). These results mostly highlight no major significant correlation between lymphopenia and lymphocyte function. No correlation was found with decreased mHLA-DR (data not shown) or SAPS II. Slightly significant correlations were observed between SOFA score and TNF ($r = -0.53$, $p = 0.01$) or IL-2 ($r = -0.52$, $p = 0.01$) when expressed as MFI in CD4T cells. From polyfunctional results, we also found negative correlations between SOFA score and triple negative CD4 cells ($r = 0.55$, $p = 0.01$) or triple negative CD8 cells ($r = 0.46$, $p = 0.01$).

4. Discussion

In the present work a new protocol for the quantification of intracellular cytokines in T lymphocytes was assessed. The approach, based on whole blood (50 μ L), is straightforward and allows the simultaneous measurement of three cytokines (TNF- α , IFN- γ , and IL-2) in subsets defined by the addition of two surface markers (CD4 and CD8). The entire protocol takes approximately 4.5 h to be completed, which seems to be quicker when compared to the usual published intracellular cytokine detection protocols that take up to 8 h [4,10,11]. In addition, the dry coating of reagents may improve standardization by reducing the pipetting steps and permitting storage at room temperature. Similar whole blood protocols reported in the literature [4,10] have certain limitations compared to the one presently reported: for instance the initial incubation requires 6 h (2 h to stimulate cells, followed by 4 h-incubation to block cytokine secretion with brefeldin) instead of only 3 h herein, a greater number of washing steps, no dried reagents (including brefeldin) and antibodies, and reagents cannot be

stored at room temperature. As we did not perform usual protocol at the same time in the present study, strict comparison of technical aspects remains to be done. That said, with only a few manual steps, the present protocol allows the technician to perform this protocol among other routine tasks. The present results aggregate with those obtained in monocytes regarding TNF- α production [7]. Taken together, they tend to highlight practical improvements in intracellular cytokine measurement.

In the delayed step of septic shock, exhaustion of T cells characterized by a loss of function (e.g. proliferation) and decrease in cytokine release is commonly described [8,12]. With the present protocol, as expected, cytokine results significantly differentiated septic shock patients from healthy volunteers. Both in CD4⁺ and CD8⁺ T cells, TNF- α and IL-2 synthesis was significantly reduced. Based on the chronology of T cell exhaustion (i.e., the first cytokine production to be stopped is IL-2, then TNF- α , and finally IFN- γ), septic patients in our study seem to be in a rather late phase of the process (loss of IL-2 and TNF- α), but are not in the latest stage since production of IFN- γ is maintained [13].

These results could be explained by analyses having been performed 1 or 2 days following the onset of septic shock, while the decrease of IFN- γ production along with impairment of other functions (e.g., proliferation) would occur later. Nevertheless, in few patients with additional samples at D3–4, no significant difference could be further detected. That said, polyfunctional analysis revealed that IFN- γ production may still be partially altered since we observed significant differences between controls and septic patients when focusing on triple positive cells both in CD4T and CD8T cells. That said, decreased IFN- γ

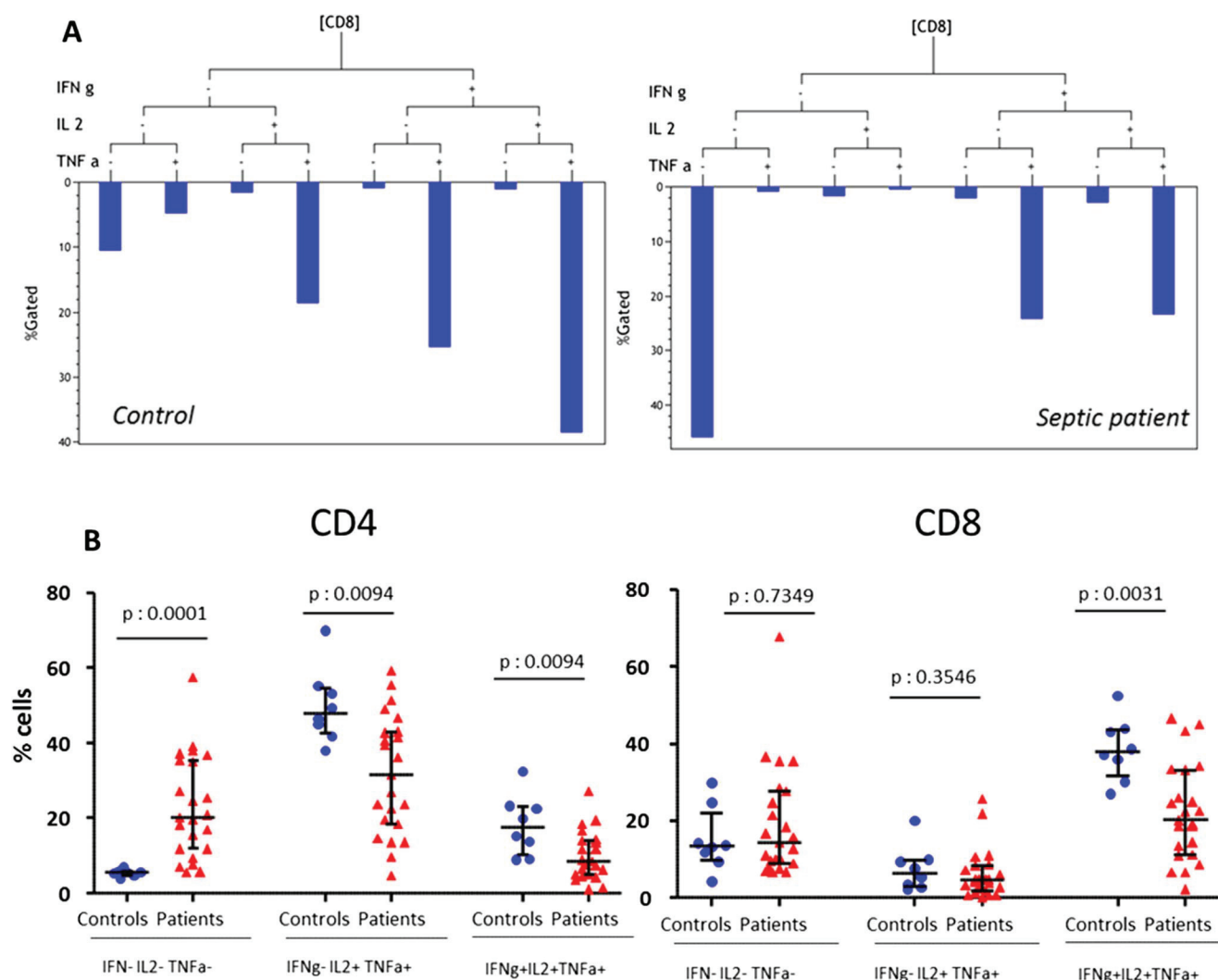


Fig. 5. Polyfunctional analysis of 3 cytokines intracellular staining. (A) Representative examples of tree analysis in CD8⁺ cells from a healthy volunteer and a septic patient. Each bar represents the percentage of cells (among CD8⁺ population) producing none, one, two or three cytokines. (B) Polyfunctional cytokine expression between controls (n = 8) and septic patients (n = 22) in CD4⁺ T-cells (left) and CD8⁺ T-cells (right). Illustrative results are represented for 3 possibilities (IFN-/IL2-/TNF-), (IFN-/IL2+/TNF+), (IFN+/IL2+/TNF+) as individualized points along with the median and IQR (p values for comparison according to Mann-Whitney test).

remains a key pathologic hallmark of sepsis and this aspect deserves to be further explored in response to more physiologic activators (e.g., TCR agonists). From a therapeutically perspective, knowing that septic lymphocytes did not enter final stage of exhaustion reinforces the potential of rejuvenating them with IL-7 [8,14].

There was no correlation between the absolute value of CD4⁺ or CD8⁺ T cells and their ability to produce cytokines. This illustrates the independence of lymphocyte functionality from lymphopenia and illustrates the potential interest of using functional testing to finely characterize patients. For instance, on the basis of a polyfunctional protocol, Snyder et al. could predict the risk of developing CMV infection in patients who received a lung transplant [15]. That said, the clinical interest of the present approach remains to be assessed.

The study does, however, present certain limitations. Firstly, this test is based on antigen-independent stimulation of the lymphocytes. Thus, flow cytometry may not be suitable for antigen stimulation as assessed by other techniques (e.g., ELISPOT). In addition, as a proof-of-concept study, the main objective of the present work was to assess feasibility of this whole blood protocol in clinical samples. Thus,

comparison to other methods for assessing intracellular cytokines production was not made, and this remains to be performed. In line with this proof of concept objective, only 3 cytokines were assessed in a relatively small number of patients were included and no conclusions as to clinical outcomes could be made (mortality, occurrence of nosocomial infections). It is particularly true for investigating the potential of polyfunctional analysis (including additional cytokines such as IL-4 or IL-10) that would be likely fully revealed in large cohort of patients allowing robust statistics. This work now deserves to be widely assessed and validated in a larger ICU population, and if possible in multicenter studies.

In conclusion, these preliminary results indicate the feasibility of this novel whole blood protocol. Its simplicity, robustness, and rapidity allow it to be integrated into a routine work load or in the monitoring of clinical trials. Beyond septic shock and ICU patients, it appears reasonable to envisage a wider use in other clinical situations where the assessment of intracellular cytokine synthesis might help in monitoring immunosuppressed patients (e.g., transplantation, cancer, immune deficiencies) or treatments modulating immune responses (e.g., biotherapies).

Table 2

Polyfunctional analysis of 3 cytokines intracellular staining. Percentages of cells (among CD8⁺ and CD4⁺ populations) producing none, one, two or three cytokines (after PMA/Ionomycin stimulation) in controls (n = 8) and septic patients (n = 22) are presented. Results are expressed as percentages of positive cells among gated cells (i.e., CD4 or CD8 cells) and as medians $\pm$ IQR.

Cytokine Positive: + Negative: –		CD4 ⁺		CD8 ⁺	
		Healthy volunteers	Septic patients	Healthy volunteers	Septic patients
IFN γ	–	5.5%	20.2%	13.4%	14.4%
IL2	–	[4.8–5.7]	[11.8–35.4]	[9.93–22.13]	[9.0–27.6]
TNF α	–				
IFN γ	–	20.5%	24.9%	4.7% [2.6–7.3]	3.9%
IL2	–	[15.7–23.4]	[21.1–30.1]		[1.9–9.7]
TNF α	+				
IFN γ	–	2.0%	2.3%	2.9% [2.0–3.9]	1.0%
IL2	+	[1.6–2.3]	[1.9–3.3]		[0.3–1.7]
TNF α	–				
IFN γ	+	0.1% [0–0.2]	0.2%	0.7% [0.6–1.2]	1.1%
IL2	–		[0.1–0.4]		[0.9–2.8]
TNF α	–				
IFN γ	–	47.9%	31.6%	6.5% [2.9–9.8]	4.8%
IL2	+	[42.6–54.7]	[18.4–43.0]		[1.9–8.4]
TNF α	+				
IFN γ	+	3.0%	4.1%	29.4%	43.5%
IL2	–	[1.4–6.5]	[1.9–7.0]	[16.8–39.1]	[35.0–53.3]
TNF α	+				
IFN γ	+	0.0% [0–0]	0.1% [0–0.2]	1.0% [0.5–1.4]	0.3%
IL2	+				[0.1–0.7]
TNF α	–				
IFN γ	+	17.6%	8.4%	37.9%	20.2%
IL2	+	[10.3–23.0]	[4.9–13.9]	[31.6–43.7]	[11.2–33.2]
TNF α	+				

Acknowledgments

This work was supported by Hospices Civils de Lyon and Université Claude Bernard Lyon 1. It was also supported by Beckman Coulter through donations of the research reagents used in this evaluation. Beckman-Coulter made no contribution to the study design, or in the collection or interpretation of the data. Similarly, Beckman Coulter had

no role in the preparation of the manuscript or the decision to submit it for publication. Beckman-Coulter product names are trademarks or registered trademarks and are used with permission. The authors would like to thank Anne Portier for technical assistance and Philippe Robinson for English editing.

References

- [1] L.D. Notarangelo, A. Fischer, R.S. Geha, J.L. Casanova, H. Chapel, M.E. Conley, C. Cunningham-Rundles, A. Etzioni, L. Hammartrom, S. Nonoyama, et al., Primary immunodeficiencies: 2009 update, *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (6) (2009) 1161–1178.
- [2] L.D. Notarangelo, Functional T cell immunodeficiencies (with T cells present), *Annu. Rev. Immunol.* 31 (2013) 195–225.
- [3] L.H. Butterfield, A.K. Palucka, C.M. Britten, M.V. Dhodapkar, L. Hakansson, S. Janetzki, Y. Kawakami, T.O. Kleen, P.P. Lee, C. Macalli, et al., Recommendations from the iSBTC-SITC/FDA/NCI Workshop on Immunotherapy Biomarkers, *Clin. Cancer Res.* 17 (10) (2011) 3064–3076.
- [4] G. Freer, L. Rindi, Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances, *Methods* 61 (1) (2013) 30–38.
- [5] D. Finco, C. Grimaldi, M. Fort, M. Walker, A. Kiessling, B. Wolf, T. Salcedo, R. Faggioni, A. Schneider, A. Ibraghimov, et al., Cytokine release assays: current practices and future directions, *Cytokine* 66 (2) (2014) 143–155.
- [6] J. John, H. Pandha, A.G. Dalgleish, Detection of T cell cytokine production as a tool for monitoring immunotherapy, *Dis. Mark.* 16 (1–2) (2000) 71–75.
- [7] G. Monneret, J. Demaret, M. Gossez, E. Reverdiu, F. Malergue, T. Rimmelé, F. Venet, Novel approach in monocyte intracellular TNF measurement: application to sepsis-induced immune alterations, *Shock* 47 (3) (2016) 318–322.
- [8] R.S. Hotchkiss, G. Monneret, D. Payen, Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (12) (2013) 862–874.
- [9] M. Singer, C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G.R. Bernard, J.D. Chiche, C.M. Cooper-Smith, et al., The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3), *JAMA* 315 (8) (2016) 801–810.
- [10] G. Freer, Intracellular staining and detection of cytokines by fluorescence-activated flow cytometry, *Methods Mol. Biol.* 1172 (2014) 221–234.
- [11] P. Pala, T. Hussell, P.J. Openshaw, Flow cytometric measurement of intracellular cytokines, *J. Immunol. Methods* 243 (1–2) (2000) 107–124.
- [12] G. Monneret, F. Venet, A. Pachot, A. Lepape, Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony, *Mol. Med.* 14 (1–2) (2008) 64–78.
- [13] E.J. Wherry, T cell exhaustion, *Nat. Immunol.* 12 (6) (2011) 492–499.
- [14] F. Venet, A.P. Foray, A. Villars-Mechin, C. Malmus, F. Poitevin-Later, A. Lepape, G. Monneret, IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients, *J. Immunol.* 189 (10) (2012) 5073–5081.
- [15] L.D. Snyder, C. Chan, D. Kwon, J.S. Yi, J.A. Martissa, C.A. Copeland, R.J. Osborne, S.D. Sparks, S.M. Palmer, K.J. Weinhold, Polyfunctional T-cell signatures to predict protection from cytomegalovirus after lung transplantation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193 (1) (2016) 78–85.

ANNEXE 7

RESEARCH

Open Access



Automated bedside flow cytometer for mHLA-DR expression measurement: a comparison study with reference protocol

Mehdi Zouiouich^{1,2}, Morgane Gossez^{1,2}, Fabienne Venet^{1,2}, Thomas Rimmelé^{2,3} and Guillaume Monneret^{1,2,4*} 

* Correspondence:

guillaume.monneret@chu-lyon.fr

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

²EA7426 "Pathophysiology of
injury-induced immunosuppression"
(University Claude Bernard Lyon 1 –
Hospices Civils de Lyon –
bioMérieux), 69008 Lyon, France
Full list of author information is
available at the end of the article

Abstract

Background: In various ICU conditions, measurement of diminished expression of human leukocyte antigen-DR on circulating monocytes (mHLA-DR) by flow cytometry appears to be a reliable marker of acquired immunosuppression. Low mHLA-DR is associated with an increased risk of nosocomial infections and mortality. Nevertheless, its use remains somewhat limited and has not been adopted in common medical practice. The main drawback of mHLA-DR measurement is likely related to the use of flow cytometry that is not accessible everywhere on a 24/7 basis. Recently, the Accellix system, a fully automated table top cytometer, was developed for use at bedside or emergency labs.

Methods: The objective was to assess the performance of the Accellix (beta site evaluation including repeatability and method comparison with reference protocol) for the measurement of mHLA-DR expression.

Results: Accellix repeatability at low and high expression levels of mHLA-DR was < 10% (i.e., within the range of acceptability for clinical flow cytometry). In comparison study including 139 blood samples (67 septic shock patients and 17 healthy volunteers), Pearson's correlation parameters (r^2) ranged from 0.71 to 0.97 ($p < 0.001$). Intra-class correlation coefficient was 0.92.

Conclusions: This fully automated table top cytometer appears to be a suitable tool for ICU patient monitoring and on-going clinical trials as there is no sample preparation and no need for specific skills in flow cytometry. Upon validation in a larger cohort study to reinforce reliability, Accellix could represent a major step to make flow cytometry accessible to clinicians by placing the instrument inside intensive care units or emergency laboratories.

Keywords: Flow cytometry, mHLA-DR, Accellix, Automated flow cytometer, Immunosuppression, Sepsis, Septic shock

Background

Septic patients and critically ill patients (i.e., trauma, burns, and stroke) develop a complex immune response that may lead to a protracted immune-suppressive state. Magnitude and persistence of immunological alterations over time have been associated with poor clinical outcomes: development of nosocomial infections, viral reactivation, and increased mortality [1]. Consequently, novel stimulating approaches recently appeared as promising therapies [1]. As there is no clinical sign for immunosuppression,

biomarkers are needed in order to both include patients and ideally to monitor response to treatment [2].

In various ICU conditions (e.g., trauma, burns, sepsis), measurement of diminished expression of human leukocyte antigen-DR on circulating monocytes (mHLA-DR) by flow cytometry appears to be a reliable marker of acquired immunosuppression [3]. Low mHLA-DR monocytes exhibit altered functionality. Clinically, low mHLA-DR is associated with an increased risk of nosocomial infections and mortality [4]. Of note, mHLA-DR has already been used for patient stratification in a small GM-CSF trial that provided encouraging results [5]. Nevertheless, despite a large body of literature showing mHLA-DR as an excellent biomarker, its use has remained somewhat limited and has not been adopted in common medical practice. Its main drawback is likely related to the use of flow cytometry. Indeed, flow cytometry facilities are—if present at hospital—usually not always available (mainly business hours). The technology requires specialized technical skills in complex fields, which may be a hurdle for clinicians not familiar with cell analysis. Recently, the Accellix system, a fully automated table top cytometer requiring only introduction of the patient sample into a cartridge, was developed for use at the bedside or in emergency labs. Sample preparation and reading are performed in a dedicated disposable cartridge. Its first application was the measurement of neutrophil CD64 overexpression for diagnosis of bacterial infection [6]. The objective of the present study was to assess the analytical mHLA-DR measurement performance of Accellix cytometer. To this end, we mainly conducted a comparison study between Accellix values and those obtained with the standardized protocol [7].

Methods

Study population

The study group consisted of 67 septic shock patients (diagnostic criteria of the International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock admitted to the surgical ICU (E. Herriot Hospital – Lyon University hospitals). Seventeen healthy volunteers were included in the study after informed consent was given. Regarding septic patients, this work belongs to a global study on ICU-induced immune dysfunctions. It has been approved by our Institutional Review Board for ethics (“Comité de Protection des Personnes Sud-Est II” #IRB 11236) and registered at French Ministry of Research and Enseignement (#DC-2008-509). Each patient or his/her relative was orally informed about objectives and conduct of this clinical study and received a note summarizing this information. Patients were included only if the non-opposition to inclusion in the study had been expressed. This was recorded in each patient’s clinical file. For this non-interventional study assessing clinical data and biological samples, oral informed consent from the patient or a relative was considered sufficient. Written informed consent is not required by French law for studies carried out in current care.

Cell preparation and flow cytometric analysis

Peripheral blood samples were obtained from routine monitoring workload collected in EDTA anticoagulant tubes: 139 samples from 67 septic patients, at different time points, and 17 healthy volunteers (flow chart in Additional file 1: Figure S1). Cells were stained according to the standardized protocol as fully described in 2005 [7, 8]. Briefly,

50 μ L of whole blood was stained with 20 μ L of QuantiBrite HLA-DR/Monocyte mixture (QuantiBrite anti-HLA-DR PE (clone L243)/Anti-monocytes (CD14) PerCP-Cy5.5 (clone MUP9), Becton Dickinson San Jose, CA, USA) at room temperature for 30 min in a dark chamber. Samples were then lysed with FACS Lysing solution (Becton Dickinson) for 15 min. After a washing step, cells were analyzed on Navios (Beckman Coulter). Monocytes were first gated out from other cells on the basis of CD14 expression, and mHLA-DR expression was then measured on their surface (mono-parametric histogram) as median of fluorescence intensity (MFI) related to the entire monocytes population (as recommended by the manufacturer). These results were then transformed to ABC (number of antibodies fixed per cell) using the response of calibrated PE-beads (BD QuantiBrite™ - PE Beads, Becton Dickinson). After staining onset, results are obtained in 60 min.

In parallel, when starting above staining, we deposited 40 μ L of whole blood on an Accellix cartridge that was immediately placed in the reader instrument (Fig. 1). This constituted the sole technical step requiring human intervention. Accellix disposable mHLA-DR cartridge-based reagents are the following: anti-HLA-DR FITC, anti-CD45 PE, anti-CD14 PE-Cy5, and Dragon Green (DG) beads (similar to FITC). Briefly, the fully automated sample processing sequence taking place inside the cartridge and driven by the instrument begins with 10-min incubation with staining antibodies and lysis buffer (i.e., red blood cells lysis takes place during staining incubation). DG beads are added at the end of the staining/lysing process and are mixed just prior to reading the sample (Fig. 1). Additional details on reagents and algorithms are also provided in Additional file 1. Measurements were calculated as mHLA-DR index, i.e., the ratio between MFI of monocyte population and MFI of beads. These index values are adjusted to partially match the units of the BD QuantiBrite anti-HLA-DR PE results.

Repeatability on Accellix

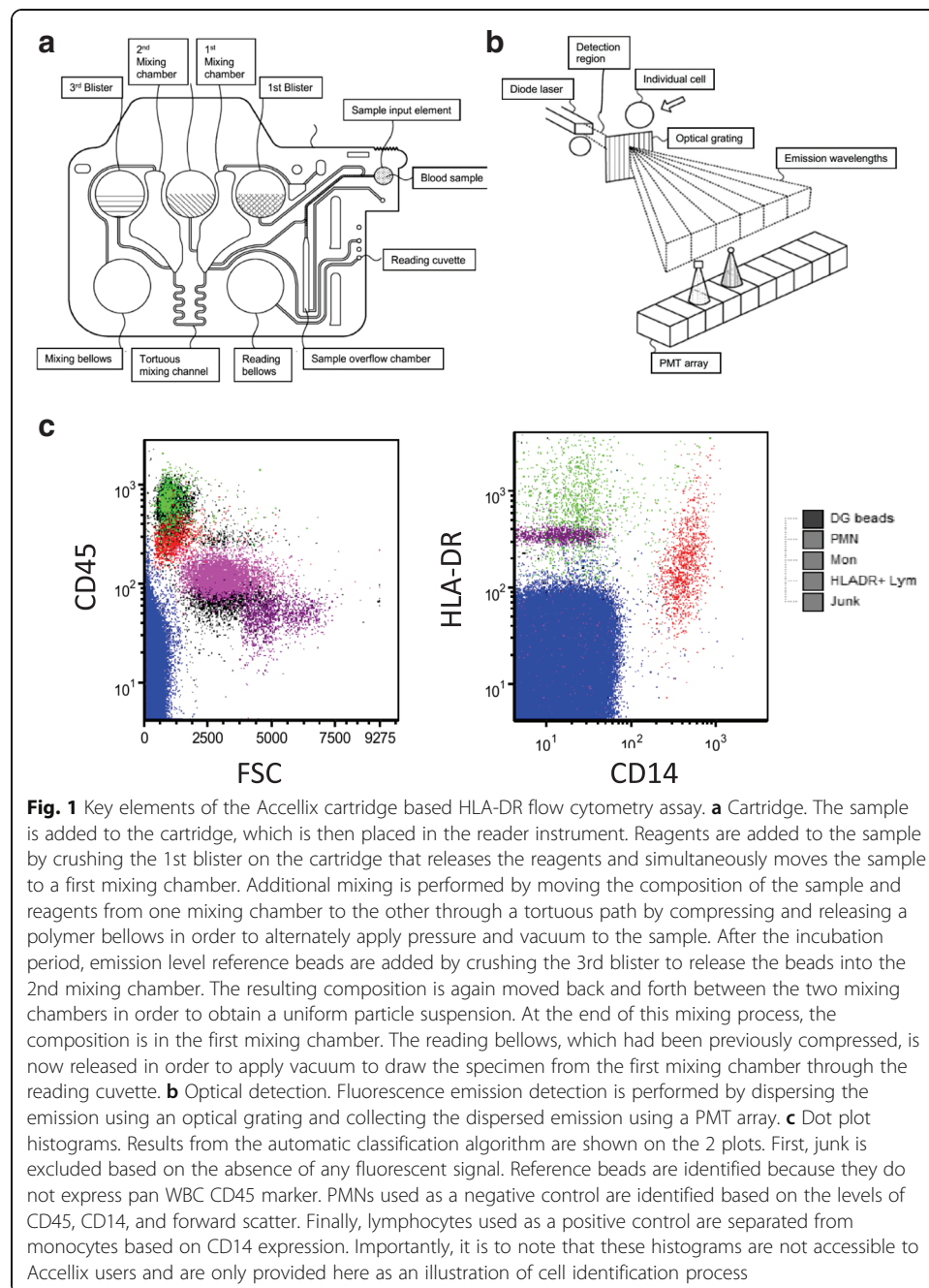
One patient and one healthy volunteer were included for the evaluation of repeatability. This was estimated as the coefficient of variation (% CV) of mHLA-DR measurements. In order to avoid the non-specific rise of mHLA-DR over time [9], blood samples were kept on ice and measurements were performed every 25 min (i.e., turnaround time on Accellix) during 3 h after sampling (i.e., $n = 6$ measurements [10]).

Statistical analysis

CV, intra-class correlation coefficient (ICC), and Passing-Bablok correlation coefficient were calculated with R Studio software (Version 0.99.902). Sample size of this study was above the recommended threshold (i.e., > 32) for an agreement study [11].

Results and discussion

Sixty-seven septic shock patients were included (53% male, mean age 72 years, mean SOFA 9, mean SAPS II 53, 28-day mortality 28%). Repeatability CV was within the range of acceptability (i.e., $< 10\%$) regarding clinical flow protocols [10, 12] for both patient and healthy volunteer samples: 8.07% (mean of mHLA-DR index = 3766) and 1.32% (mean of mHLA-DR index = 42,644) obtained from 6 time points. As observed for other flow cytometry parameters, it is usual to observe higher CV with low values

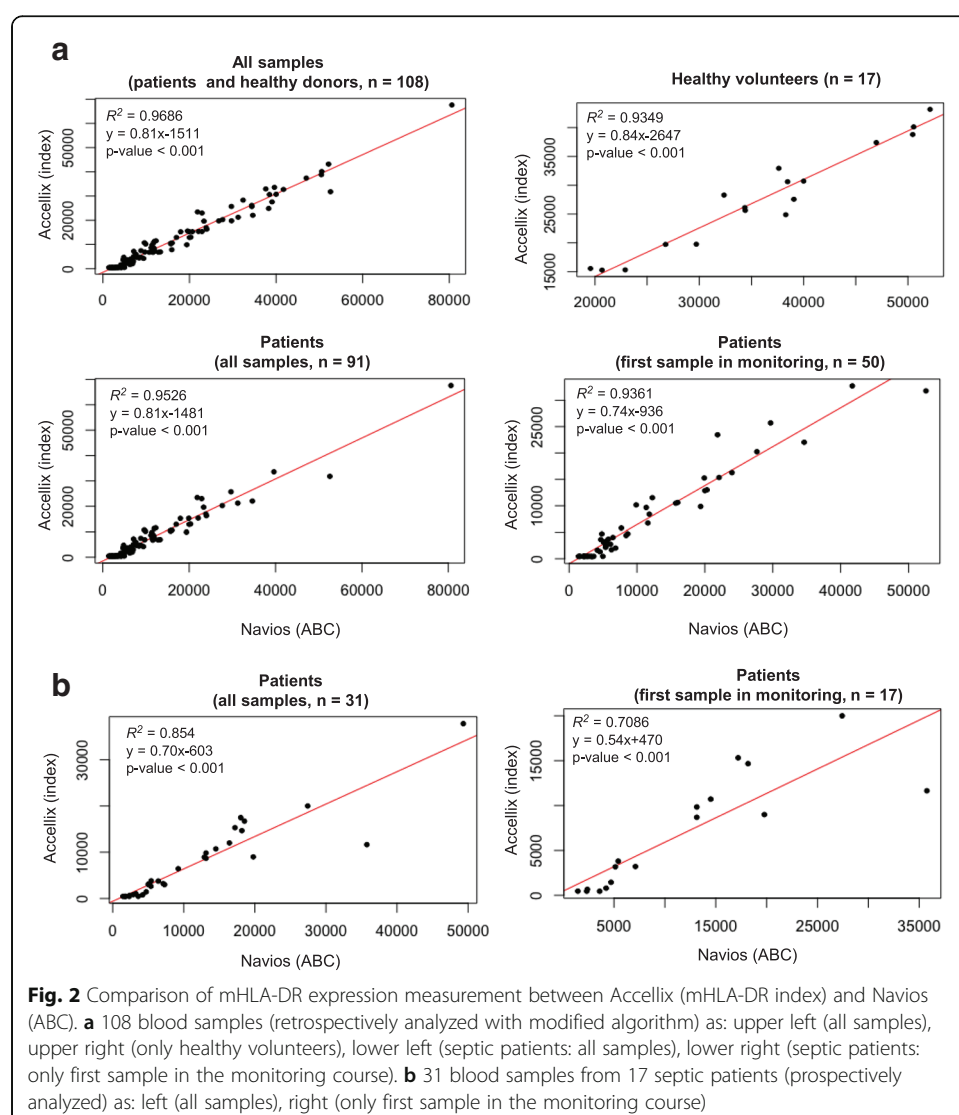


(e.g., CD4 counts; [12]). Overall, correlation between the two cytometers was satisfactory. First part of the study was conducted on 108 samples from 50 septic shock patients and 17 healthy volunteers. Correlation parameters were found to be $R^2 = 0.77$, $y = 0.8192 \times -552$ ($p < 0.001$, linear model) and $y = 0.8186x - 1616$ (Passing-Bablok regression). Nevertheless, 3 outliers were identified. In these cases, after carefully checking histograms from the usual flow cytometry protocol, Accellix values appeared to be in error. One likely reason was the presence of a significant neutrophil population with increased auto-fluorescence. To fix this issue, a new algorithm was developed and installed on Accellix. We could retrospectively reanalyze the first 108 samples.

Correlation results are presented in Fig. 2a; there was no longer a discrepancy. For the whole cohort, the Pearson correlation parameters were found to be $R^2 = 0.9686$, $y = 0.8099x - 1511$ ($p < 0.001$). ICC was also high at 0.92 indicating very good concordance between both measurements. When data were split to differentiate results obtained in healthy donors versus septic patients or when only one sample per patient was kept in the analysis (to decrease potential bias associated to serial sampling from the same patient), correlation parameters remained very good (Fig. 2a).

After installation of the modified algorithm, we prospectively included 32 additional blood samples from 17 septic patients. Correlation analysis of these samples yielded similar results to those obtained for the first 108 samples ($R^2 = 0.85$, $y = 0.70x - 603$, $p < 0.001$; Fig. 2b). We did not identify any aberrant result.

Of note, correlation parameters (intercept -1511 or -538) suggest that Accellix results are lower than those from usual flow cytometry. This result is actually not perfectly accurate as limit of blank (LOB) for Accellix is about 450 (mHLA-DR index) corresponding to about 2400 ABC on Navios. Below this threshold, Accellix provided



results as $< \text{LOB}$. In our analysis, when Accellix gave $< \text{LOB}$ results, we plotted 450 to draw the curve. This may explain that for very low values of mHLA-DR, correlation is less good. Importantly, it should be kept in mind that this potential drawback would have no consequence in clinics. Indeed, to date, the cutoff used to stratify patients in immunostimulation trial is 8000 AB/C [5] which would approximately correspond to 5000 mHLA-DR index on Accellix (extrapolation from correlation curves), which is largely above Accellix LOB. Patient with $< \text{LOB}$ Accellix values have to be considered very sick (at least, from an immunological perspective). With them, kinetics aspect would be what matters the most (i.e., is the patient recovering mHLA-DR expression over time?).

Finally, it is important to report that during repeatability study, we noticed a discrepancy for a single value (mHLA-DR index = 45,000 whereas all other values were about 3800). After checking, it was due to a fluidic issue that gave no error message. This obviously aberrant measurement was not taken into account in CV calculation. Since the flow cytometer did not provide any error message, this deserves further explorations from the manufacturer.

Overall, at this stage, except for this aberrant value out of 139 measurements, this first beta-site Accellix study regarding mHLA-DR assessment is very encouraging. Although we had no access to the algorithm and flow histograms, we noticed satisfactory results for a comparison study. In addition, despite known pre-analytical issues [9], repeatability results were found to be within acceptable range for flow cytometry. To date, mHLA-DR, although providing excellent information, has remained underutilized due to the difficulty to use/have access to flow cytometry. In contrast, Accellix may provide a workable solution for this problem. The sole human intervention is to deposit about 40 μL of whole blood on the cartridge. As there is no flow histogram available on Accellix, there is no interpretation of the results based on usual gating strategy or fluorescence compensation. No specific technical skills in flow cytometry are thus required. Accellix provides a result as mHLA-DR index—nothing else. Thus, Accellix may be installed directly in ICUs or in 24/7 emergency labs where traditional flow cytometer are not present. Beyond routine monitoring, in the short term, it may facilitate managing multicentered clinical trials based on mHLA-DR patient stratification. To date, the main Accellix drawback lies in the fact that it can only analyze a single cartridge at a time and requires 25 min to do so. This implies a need to correctly schedule blood sampling and analysis onset when multiple samples are to be analyzed simultaneously as blood cannot be stored for too long before mHLA-DR staining. By nature, in a beta site evaluation, clinical decision-making thresholds are not investigated. Thus, a next important step would be to conduct a comparative study in a larger cohort of patients to define and assess those thresholds in predicting mortality and/or secondary infection occurrence and to evaluate how they interface with usual values from HLA-DR as ABC obtained with standard protocol.

Conclusions

Overall, this fully automated table top cytometer may be a suitable tool for ICU patient monitoring and on-going clinical trials as there is no need for sample preparation and results are quickly obtained (under 30 min for each cartridges). As a first beta site evaluation, results are promising, and upon validation in a larger cohort study to

reinforce reliability, Accellix could be a major step to make flow cytometry accessible to clinicians by placing the machine directly in intensive care units (ICU) or emergency laboratories. If first results of immunostimulation trials are encouraging, mHLA-DR on Accellix might become a very popular parameter.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Flow chart and additional methods. (DOCX 67 kb)

Abbreviations

AB/C: Antibody per cell; CD: Cluster of Differentiation; GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor; HV: Healthy volunteer; ICU: Intensive care unit; LOB: Limit of blank; mHLA-DR: Human leukocyte antigen-DR on monocytes

Acknowledgements

None

Funding

In addition to Hospices Civils de Lyon and Lyon I University, this study was supported by LeukoDx through donations of laboratory equipment and supplies.

Availability of data and materials

Not applicable

Authors' contributions

MZ and GM designed the study. TR included the patients. MZ collected and analyzed the data. MZ and GM wrote the manuscript. MZ, GM, FV, and MG revised the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The sponsors of the study had no role in study design, data collection, and analysis and interpretation or writing of the report. The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, E. Herriot Hospital, 69003 Lyon, France. ²EA7426 "Pathophysiology of injury-induced immunosuppression" (University Claude Bernard Lyon 1 – Hospices Civils de Lyon – bioMérieux), 69008 Lyon, France. ³Hospices Civils de Lyon, Anesthesiology and Intensive Care department, E. Herriot Hospital, 69003 Lyon, France. ⁴Cellular Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot – Hospices Civils de Lyon, Pavillon E – 5 place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France.

Received: 20 April 2017 Accepted: 24 August 2017

Published online: 30 August 2017

References

1. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13:862–874
2. Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus D, Calandra T, Jaton K, Giulieri S, Delaloye J, Opal S, Tracey K, Van der Poll T, Pelfrene E (2015) Sepsis : a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis* 15:581–614
3. Monneret G, Venet F (2015) Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry B Clin Cytom* 90:376–386
4. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G (2013) Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 25:477–483
5. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD (2009) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 180:640–648

6. Sprung CL, Morales RC, Kasdan H, Reiter A, Keren S, Meissonnier J (2015) Comparison of cd64 levels performed by the facs and accellix systems. In: Book comparison of cd64 levels performed by the facs and accellix systems, p A1012
7. Docke WD, Hoflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk HD, Kunz D (2005) Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 51:2341–2347
8. Demaret J, Walencik A, Jacob MC, Timsit JF, Venet F, Lepape A, Monneret G (2013) Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom* 84:59–62
9. Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard AL, Gutowski MC, Bienvenu J, Lepape A (2002) Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem* 48:1589–1592
10. Davis BH, McLaren CE, Carcio AJ, Wong L, Hedley BD, Keeney M, Curtis A, Culp NB (2013) Determination of optimal replicate number for validation of imprecision using fluorescence cell-based assays: proposed practical method. *Cytometry B Clin Cytom* 84:329–337
11. Liao JJ (2010) Sample size calculation for an agreement study. *Pharm Stat* 9:125–132
12. Gossez M, Malcus C, Demaret J, Frater J, Poitevin-Later F, Monneret G (2016) Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation. *Cytometry B Clin Cytom*. doi:10.1002/cyto.b.21360. [Epub ahead of print]

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

ANNEXE 8

NOVEL APPROACH IN MONOCYTE INTRACELLULAR TNF MEASUREMENT: APPLICATION TO SEPSIS-INDUCED IMMUNE ALTERATIONS

Guillaume Monneret,^{*†‡} Julie Demaret,^{*†} Morgane Gossez,^{*†} Elsa Reverdiau,^{*} Fabrice Malergue,[§] Thomas Rimmelé,^{†||} and Fabienne Venet^{*†}

^{*}Immunology Laboratory, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France; [†]EA 7426 PI3 “Pathophysiology of Injury-induced Immunosuppression” (Université Claude Bernard Lyon I—Hospices Civils de Lyon—bioMérieux), Lyon, France; [‡]TRIGGERSEP (TRIAL Group for Global Evaluation and Research in SEpsis), F-CRIN Network, Limoges, France; [§]Beckman Coulter Immunotech, Life Sciences Global Assay and Applications Development, Marseille, France; and ^{||}Department of Anesthesiology, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Received 27 May 2016; first review completed 27 Jun 2016; accepted in final form 1 Aug 2016

ABSTRACT—Objective: The monitoring of septic shock induced immunosuppression has been proposed to identify patients who could benefit from specific immunoadjuvant therapies. Among potential biomarkers to monitor immunological status, functional testing remains the gold standard because it directly measures the capacity of a cell population to respond to an immune challenge. We investigated a new approach in intracellular staining for flow cytometry to measure tumor necrosis factor (iTNF) produced *in vitro* by monocytes in response to lipopolysaccharide. **Design, Setting, Subjects, and Interventions:** Observational study in intensive care unit and immunology laboratory of a university medical center. Sixteen septic shock patients and eight control subjects were included. **Main Results:** Monocyte iTNF was determined by flow cytometry in whole blood and completed in 2.5 h according to a no-wash, no centrifuge procedure. Lipopolysaccharide challenge induced a tremendous expression of iTNF that was statistically more pronounced in controls than in patients. This was observed when results were expressed as medians of fluorescence intensity (median: 16.1 [IQR: 14.5–19.1] vs. 5 [4.0–8.0], $P=0.0001$) or as percentages of positive cells (99.7 [99.6–99.8] vs. 85 [74–97], $P=0.0001$). iTNF expression was correlated to monocyte HLA-DR expression in patients and controls. **Conclusions:** These preliminary results illustrate the feasibility of immune functional testing on a routine manner in septic shock patients. They now deserve to be widely assessed and validated in various intensive care unit conditions. This could be a major step to characterize the rapidly changing immune response overtime and thus permit personalized medicine.

KEYWORDS—HLA-DR, immunosuppression, monocyte, sepsis, septic shock, tumor necrosis factor

INTRODUCTION

Sepsis has been recently qualified as the quintessential medical disorder of the 21st century (1). It is the most frequent cause of death in intensive care unit (ICU) patients while, to date, no therapeutic intervention has specifically been approved for its treatment. While sepsis has been usually described as inducing a tremendous systemic inflammatory response, current data indicate that it initiates a more complex immunologic response that evolves over time, with the simultaneous occurrence of both pro- and anti-inflammatory mechanisms (1, 2). As a result, after a short unbridled pro-inflammatory phase, septic

patients present with profound immunosuppression that would prevent efficient clearing of the primary infection despite adequate antibiotics (3–5). This immune defect is also illustrated by reactivation of latent viruses (CMV or HSV) or increased nosocomial infections due to pathogens, including fungi, which are normally weakly virulent or opportunistic (3). Although secondary infections may contribute only modestly to overall mortality (6), globally, these alterations are believed to be responsible for worsening outcome in patients who survived initial resuscitation since the magnitude and persistence over time of immunosuppression is known to be associated with increased mortality. In accordance, it is reported that a majority of deaths occur after the first 3 days of the disorder (7, 8). Consequently, new therapeutic options based on adjunctive immunostimulation (IFN- γ , GM-CSF, IL-7, anti-PD1/L1 antibodies) are emerging (9). Nevertheless, as there is no clinical sign of immune dysfunctions, such intervention relies on biomarkers for identifying the patients who could benefit from immunostimulation (i.e., the most immunosuppressed). Among potential biomarkers, immunologically speaking, functional testing remains the gold standard because it directly measures the capacity of a cell population to respond to an immune challenge (10, 11). However, these protocols although providing excellent insights regarding pathophysiology remain barely usable on a routine clinical monitoring basis (long incubation time, lengthy cell purification procedures, low standardization).

Address reprint requests to Prof Guillaume Monneret, PharmD, PhD, Cellular Immunology Laboratory, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Pavillon E-5 place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France.
E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

This work was supported by Hospices Civils de Lyon and Université Claude Bernard Lyon 1. It was also supported by Beckman Coulter through donations of the research reagents used in this evaluation. Beckman Coulter made no contribution in the study design, or in the collection or interpretation of the data. Similarly, Beckman Coulter had no role in the preparation of the manuscript or the decision to submit it for publication. Beckman Coulter product names are trademarks or registered trademarks and are used with permission.

FM is an employee of Beckman Coulter.

The authors report no conflicts of interest.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citation appears in the printed text and is provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.shockjournal.com).

DOI: 10.1097/SHK.0000000000000724

Copyright © 2016 by the Shock Society

Thus, one current major challenge is to abolish the gap between functional testing for comprehensive studies and functional testing usable on routine clinical daily practice (12).

Although observed in whole blood including a mixture of various cell types, the decreased capacity to release pro-inflammatory cytokines (mainly tumor necrosis factor [TNF]) in response to endotoxin challenge is considered a pivotal feature of altered monocyte functionality during sepsis-induced immunosuppression (13, 14). As intracellular flow cytometry allows determination of both cell function and phenotype at the same time, the detection of cytokines directly inside cells producing them is one of the most elegant ways to assess immune reactivity of a given cell subset (15). We took advantages from recent improvements in intracellular staining for flow cytometry to design a rapid and simple protocol to measure *in vitro* TNF production by monocytes in response to lipopolysaccharide (LPS) (no cell purification, no wash, no centrifuge procedure). The aim of this study was thus to evaluate feasibility in clinic and suitability to routine workload of this novel whole blood technique for the measurement of intracellular TNF production in monocytes. This was performed in the clinical context of septic shock. In addition, considering the large body of literature describing the potential of monocyte HLA-DR (mHLA-DR) in monitoring septic patients (11), we also assessed the interest and feasibility of including HLA-DR staining within a single tube that would concomitantly explore TNF and HLA-DR expression in monocyte.

PATIENTS AND METHODS

Study population

The study group consisted of 16 septic shock patients (diagnostic criteria of the International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock) (16), admitted to the surgical ICU (details provided in supplemental digital content, <http://links.lww.com/SHK/A452>).

Research reagents

We used unitized 12 × 75 mm tubes containing a dry coating of LPS (from *E coli* O127:B8, final concentration: 200 ng/mL, Sigma [Saint-Quentin-Fallavier, France]), and brefeldin A to block cytokine secretion via the Golgi apparatus and unitized 12 × 75 mm tubes containing a dry coating of conjugated antibodies formulated for this assay: Krome Orange (KrO)-labeled anti-CD14 (clone RMO52), Alexa fluor-700 (AF700)-labeled anti-TNF (clone IPM2), and phycoerythrin (PE)-labeled anti- HLA-DR (clone Immu-357). These research reagents are custom-made reagents, optimized for this research evaluation by Beckman Coulter Immunotech, and are not available as commercial products.

Intracellular staining procedure

Heparin anticoagulated blood was collected from patients during the first 24 h after diagnosis of septic shock. Fifty microliters of undiluted whole blood was directly added to the stimulation tube (LPS-BrefA), or to an empty control tube, then incubated 2 h at 37°C. Samples were then treated according to the regular PerFix-no centrifuge (nc) (Beckman Coulter, Brea, Calif) procedure: in brief, fixation of the sample was conducted for 15 min at room temperature, applying 5 µL of PerFix-nc Fixative Reagent, followed by 15 min permeabilization and concomitant staining at room temperature in the dark (dried antibodies were resuspended extemporaneously with 300 µL of the Permeabilizing Reagent, this mixture being added to the primary reaction tube). Finally, reaction was terminated by adding 2.5 mL of PerFix-nc final reagent. After vortexing, cells were ready to be acquired on flow cytometer. Overall, it is a no wash, no centrifuge procedure completed in precisely 2.5 h. A schematic protocol representation is presented in Figure S1 (supplemental digital content, <http://links.lww.com/SHK/A452>).

Flow cytometric data acquisition and analysis

Data acquisition was performed on a Navios Flow Cytometer using Kaluza software for data analysis (Beckman Coulter, Brea, Calif). There was no compensation applied, since only fluorochemicals without spectral overlap were selected to eliminate the need for compensation insuring a better robustness to the assay. Monocytes were first gated out from other cells on the basis of labeling with CD14. Intracellular TNF (iTNF) expression was then measured on this selected population (CD14 high). All results were expressed either as percentages of TNF-positive monocytes (% positive cells) among the total monocyte population (positivity threshold was defined with non-stimulated values from healthy donors) or as means of fluorescence intensity (MFI) of the entire monocyte population. According to same gating strategy of monocytes, we also determined HLA-DR expression on their surface and expressed results as MFI thanks to antibodies against HLA-DR (clone Immu-357) included in the same tube. Thereafter, this mHLA-DR value will be called experimental HLA-DR (expHLA-DR) to avoid any confusion with mHLA-DR expressed as ABC and obtained through standardized protocol.

Details on mHLA-DR measurement (standardized protocol) and statistical analysis are provided in supplemental digital content, <http://links.lww.com/SHK/A452>.

RESULTS

Patients

Sixteen septic shock patients and eight healthy controls were included. Clinical and biological characteristics are listed in Table S1 (supplemental digital content, <http://links.lww.com/SHK/A452>). Briefly, median values for age, SAPS II, and SOFA scores at onset of shock were 66 (interquartile range [IQR] 61–72), 67 [IQR 51–81], and 10 [IQR 9–12] respectively. Five patients died within 28 days (mortality = 31%) and secondary nosocomial infections were diagnosed in three patients (19%). At D3–4, septic shock patients presented with usual characteristics of injury-induced immunosuppression with a reduced mHLA-DR expression, low CD4+ lymphocyte count, and an increased percentage of circulating Treg cells in comparison with normal values (supplemental digital content, Table S1, <http://links.lww.com/SHK/A452>).

Intracellular TNF results

As expected, LPS challenge induced a tremendous expression of iTNF (Fig. 1). This increase was statistically more pronounced in controls than in patients. This was observed when results were expressed as MFI (16.1 [IQR 14.5–19.1] vs. 5 [IQR 4.0–8.0], $P = 0.0001$) or as percentage of positive cells (99.7 [IQR 99.6–99.8] vs. 85 [IQR 74–97], $P = 0.0001$, Fig. 2). When considering controls and patients values as a whole, iTNF expression was correlated to mHLA-DR expression (standardized measurement as ABC) at day 3 ($r: 0.79$, $P < 0.0001$). This correlation was less obvious when solely focusing on values from septic patients (Figure S2, supplemental digital content, <http://links.lww.com/SHK/A452>). It may indicate that for a given mHLA-DR level (herein most values <10,000 ABC), various degrees of functionality may be measured.

expHLA-DR expression in stimulated samples (LPS-BrefA)

In addition to mHLA-DR results obtained by the standardized protocol in a separate tube, we also assessed expHLA-DR expression in the iTNF tube. One potential issue was the necessity to incubate cells at +37°C as it is well known

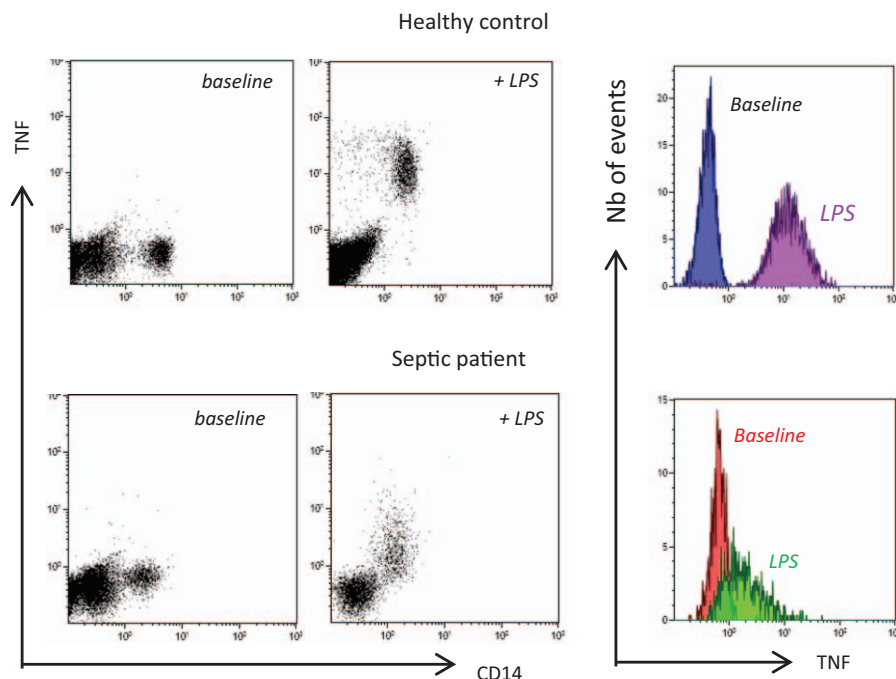


FIG. 1. **Flow cytometry histograms of intracellular TNF in monocytes.** Left: CD14 (x axis) and TNF (y axis) representation of leukocytes (ungated) with or without LPS challenge (2 h at +37°C) in healthy control and septic patient (representative examples). In CD14+ cells, LPS induces a shift toward higher TNF expression. Right: overlay representation of intracellular TNF expression (monoparametric histogram) with or without LPS challenge in monocytes (gated from CD14+ population) in one healthy control and one septic patient (representative examples). TNF indicates tumor necrosis factor.

that monocyte HLA-DR artificially rises up if staining is not rapidly processed after sampling (17). Actually, this enhancement was not seen in patients' samples but only in healthy controls (Figure S3, supplemental digital content, <http://links.lww.com/SHK/A452>). We obtained good correlations between mHLA-DR and expHLA-DR (+4°C) or expHLA-DR (+37°C), correlation coefficients were 0.68 (P : 0.004) and 0.70 (P : 0.003) respectively. We observed an excellent correlation between iTNF and expHLA-DR results (Figure S4, supplemental digital content, <http://links.lww.com/SHK/A452>), even when focusing only on septic patients. This indicates that a tricolor protocol (CD14-iTNF-HLA-DR) would be feasible (in a single tube with 50 μ L whole blood) and provide both crucial information: mHLA-DR expression and

monocyte capacity to respond to LPS challenge (i.e., functional testing).

DISCUSSION

The weight of evidence now supports the view that the immune-suppressive phase is the predominant immunological response in most septic patients (18). As there is no clinical sign of immune dysfunctions, it is crucial to identify the best biological tools for patients' stratification according to their immune status. Since it directly measures *ex vivo* capacity of a cell population to respond to an immune challenge, functional testing ideally represents the best method to establish the occurrence of immunosuppression. Regarding monocytes,

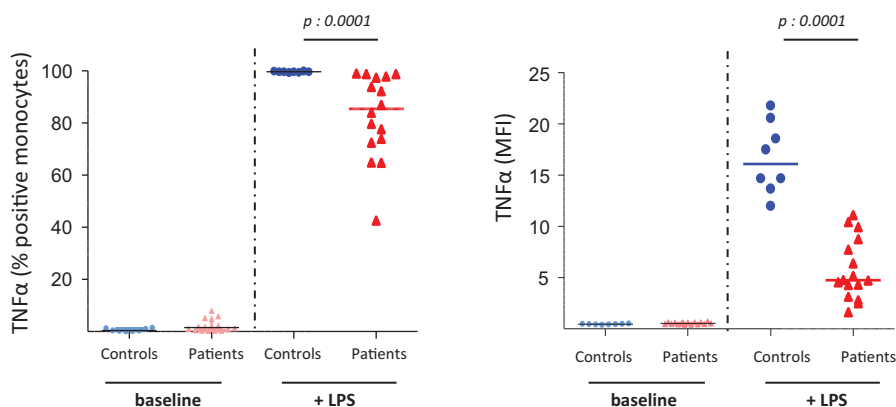


FIG. 2. **Monocyte intracellular TNF expression.** Results are presented with and without LPS challenge (2 h at +37°C) in eight control donors and 16 patients with septic shock. Left: results expressed as percentage of positive monocyte for TNF. Right: results as mean of fluorescence intensity (MFI). Statistics: Mann-Whitney test. TNF indicates tumor necrosis factor.

many groups have described the altered capacity of septic patients' cells to release pro-inflammatory cytokines in response to stimulation with LPS, various TLR agonists, or whole bacteria *in vitro* (13, 14, 19, 20). These tests, based on cytokine measurements in whole blood supernatant, represent reliable methods to assess the phenomenon of endotoxin tolerance, i.e., refractory state to subsequent endotoxin challenge (13). That said, they are not really suitable to routine monitoring as they are time consuming (incubation time + centrifugation + cytokine Elisa assay) and not standardized yet (19, 21). Intracellular cytokine staining protocols, commonly used in experimental studies, would be an attractive alternative (15). To our knowledge, nothing has been conducted in significant clinical cohorts of septic patients whereas preliminary results provided convincing results. Indeed, Fumeaux et al. (22) observed that septic monocytes were characterized by an altered IL-10/TNF intracellular ratio. Again, it is likely due to lengthy protocols including many permeabilization/staining/wash/centrifugation/incubation steps (15, 23). Recently, progress has been made regarding intracellular protocol for flow cytometry (e.g., Foxp3) (24). This is also true for functional testing based on intracellular parameter determination. A typical example is provided by whole blood phospho-STAT5 measurement in response to IL-7 stimulation (25). The entire protocol takes 90 min to be completed in one step. It provided promising results in septic shock patients in which it could differentiate survivors from non-survivors depending on their STAT5 response upon IL-7 challenge (26).

In the present work, we took advantage from recent progress for intracellular staining flow cytometry to design and evaluate a new protocol dedicated to cytokine detection in monocytes. Within the context of sepsis-induced immunosuppression, measurement of iTNF would constitute a real improvement since simple, rapid, and robust functional testing is regularly desired in order to better define immune status of patients. Overall, the setup of the protocol was easy in our hands and we did not report major issue. It takes only twice 50 μ L of whole blood (unstimulated and LPS-stimulated conditions). It is a no-wash, no-centrifuge procedure and everything is standardized in tubes thanks to the dry coating of reagents (what further reduces the pipetting steps). Of note, these dried reagents are stable at room temperature. Functional results are obtained in 2.5 h and flow histograms are easy to interpret, without any compensation needed. In addition, results are specific for a given cell type (i.e., monocyte) whereas usual TNF release test measures cytokine production from all mixed cells contained in whole blood (21). As depicted in Figure S1 (<http://links.lww.com/SHK/A452>), manual interventions are very limited meaning that a technician could easily manage several samples in parallel with other routine tasks (this was not the case with former protocols). Thus, technically speaking, we made the proof of concept that this iTNF protocol could be an appropriate tool for routine work. In addition, we would like to emphasize that, beside the availability of flow cytometers in routine hospital labs that could be a limiting factor, no strong flow cytometry skills are required for users as this is a ready-to-use kit performed in whole blood (no need for cell purification) that does not need any fluorescence compensation (limitation in

most FACS protocols and for standardization in multicentric studies). As far as intracellular flow cytometry measurements, it appears difficult to design a simpler functional protocol. Thus, we strongly believe that the adaptability of this test to general clinical setting can be very good and that, upon validation in larger cohorts of patients, this protocol may become a real tool for patients' monitoring. In addition, upon validation in a larger cohort of patients, one may likely skip the nonactivated tube as we did not detect any iTNF both in controls and septic patients (i.e., no baseline production). The present preliminary patients' results look very promising as there was a major fall in TNF production in monocytes from septic patients. In addition, iTNF values were nicely correlated to mHLA-DR values at day 1 to 2 and day 3 to 4 (gold standard in the field). Although it should be explored in larger cohorts of patients, monocyte reactivity might be even more informative than mHLA-DR regarding association with deleterious outcome. Moreover, we also reported that both intracellular and cell surface staining are concomitantly doable suggesting the possibility of a kit including both iTNF and mHLA-DR values. Overall, preliminary results are encouraging and this approach might become a standard tool to stratify patient for trial enrolment or to manage drug efficacy. Indeed, whole-blood TNF release has been once used to stratify patients in a small clinical trial evaluating GM-CSF as an immuno-adjuvant therapy in pediatrics (27), whereas administration of GM-CSF to adult septic patients induced a restoration of *ex vivo* TNF- α production capacity (28).

Of note, one potential drawback of this approach remains the use of flow cytometry which is not, to date, available everywhere and often linked to specialized laboratories. In addition, our study presents with limitations mostly inherent to the fact we conducted a proof of concept study. Indeed, this work was not designed to improve our understanding of septic shock pathophysiology but rather to evaluate in clinical conditions the feasibility of such an innovative functional assay. Results are thus preliminary as we only included 16 patients. We did not provide comparison with TNF whole-blood release or with alternate iTNF intracellular staining (based on usual protocol in purified cells). However such comparisons should now be performed in a further study. Due to ethical reason, we only got a single time point of blood sampling (day 1). So, we cannot speculate on later time points in patients' evolution. In addition, healthy volunteers were not strictly age-matched with septic shock patients so we cannot definitely rule out an effect of age on our results. That said, it has been recently reported that the loss of *in vitro* TNF release in septic patients was not due to age (14). Lastly, we obviously could not investigate association with clinical outcomes as our study was not powered for such purposes.

CONCLUSION

Overall, these preliminary results indicate the reliability of this novel iTNF protocol that deserves now to be widely assessed and validated in various ICU conditions. In sepsis, innovative immunomonitoring strategies that characterize the host immune response and thus permit personalized medicine approaches appear as a reasonable perspective. This would allow to decrease

heterogeneity of septic population and to better take into account the rapidly changing immune response overtime after initial infection, from exacerbated inflammation to severe immunosuppression. For such purposes, the possibility of obtaining functional testing on routine manner could be a major step.

REFERENCES

1. Deutschman CS, Tracey KJ: Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* 40:463–475, 2014.
2. Angus DC, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369:840–851, 2013.
3. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13:862–874, 2013.
4. Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, Dunser MW: Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg* 108:1841–1847, 2009.
5. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD 2nd, Kreisel D, Krupnick AS, et al.: Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306:2594–2605, 2011.
6. van Vught LA, Klein Klouwenberg PM, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, Schultz MJ, Numborg P, Bonten MJ, Cremer OL, et al.: Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA* 315:1469–1479, 2016.
7. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rodel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC: The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 15:R183, 2011.
8. Daviaud F, Grimaldi D, Dechartres A, Charpentier J, Geri G, Marin N, Chiche JD, Cariou A, Mira JP, Pene F: Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care* 5:58, 2015.
9. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13:260–268, 2013.
10. Monneret G, Venet F: Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry B Clin Cytom* 90:376–386, 2016.
11. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G: Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 25:477–483, 2013.
12. Monneret G, Venet F: Immune functional testing in clinics: feasibility and prediction of deleterious outcomes. *Crit Care Med* 41:367–368, 2013.
13. Biswas SK, Lopez-Collazo E: Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 30:475–487, 2009.
14. van Vught LA, Wiewel MA, Hoogendijk AJ, Scicluna BP, Belkasim-Bohoudi H, Horn J, Schultz MJ, van der Poll T: Reduced responsiveness of blood leukocytes to lipopolysaccharide does not predict nosocomial infections in critically ill patients. *Shock* 44:110–114, 2015.
15. Freer G, Rindi L: Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances. *Methods* 61:30–38, 2013.
16. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: 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, 1992.
17. Docke WD, Hoflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, et al.: Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 51:2341–2347, 2005.
18. Opal SM: The current understanding of sepsis and research priorities for the future. *Virulence* 5:1–3, 2014.
19. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A: Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 14:64–78, 2008.
20. Cavaillon JM, Adib-Conquy M: Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 10:233, 2006.
21. Segre E, Fullerton JN: Stimulated whole blood cytokine release as a biomarker of immunosuppression in the critically ill: the need for a standardized methodology. *Shock* 45:490–494, 2016.
22. Fumeaux T, Dufour J, Stern S, Pugin J: Immune monitoring of patients with septic shock by measurement of intraleukocyte cytokines. *Intensive Care Med* 30:2028–2037, 2004.
23. Pala P, Russell T, Openshaw PJ: Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 243:107–124, 2000.
24. Demaret J, Saison J, Venet F, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Ferry T, Monneret G: Assessment of a novel flow cytometry technique of one-step intracellular staining: example of FOXP3 in clinical samples. *Cytometry B Clin Cytom* 84:187–193, 2013.
25. Dupont G, Demaret J, Venet F, Malergue F, Malcus C, Poitevin-Later F, Morel J, Monneret G: Comparative dose-responses of recombinant human IL-2 and IL-7 on STAT5 phosphorylation in CD4+FOXP3- cells versus regulatory T cells: a whole blood perspective. *Cytokine* 69:146–149, 2014.
26. Demaret J, Dupont G, Venet F, Friggeri A, Lepape A, Rimmele T, Morel J, Monneret G: 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, 2015.
27. Hall MW, Knatz NL, Vetterly C, Tomarello S, Wewers MD, Volk HD, Carcillo JA: Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 37:525–532, 2011.
28. Meisel C, Schefold JC, Pischowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, et al.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 180:640–648, 2009.



REFERENCES

REFERENCES

- 1 Bone, R. C. *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* **101**, 1644-1655 (1992).
- 2 Delano, M. J. & Ward, P. A. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev* **274**, 330-353 (2016).
- 3 Levy, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* **31**, 1250-1256 (2003).
- 4 Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801-810 (2016).
- 5 Lelubre, C. & Vincent, J. L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol* **14**, 417-427 (2018).
- 6 Vincent, J. L. *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* **22**, 707-710 (1996).
- 7 Reinhart, K. *et al.* Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* **377**, 414-417 (2017).
- 8 Fleischmann, C. *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* **193**, 259-272 (2016).
- 9 Vincent, J. L. *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* **34**, 344-353 (2006).
- 10 Fleischmann, C. *et al.* Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* **113**, 159-166 (2016).
- 11 Quenot, J. P. *et al.* The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care* **17**, R65 (2013).
- 12 Brun-Buisson, C., Meshaka, P., Pinton, P. & Vallet, B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* **30**, 580-588 (2004).
- 13 Brun-Buisson, C. *et al.* Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* **274**, 968-974 (1995).
- 14 Pavon, A. *et al.* Profile of the risk of death after septic shock in the present era: an epidemiologic study. *Crit Care Med* **41**, 2600-2609 (2013).

- 15 Vincent, J. L. *et al.* Comparison of European ICU patients in 2012 (ICON) versus 2002 (SOAP). *Intensive Care Med* **44**, 337-344 (2018).
- 16 Rhee, C. *et al.* Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. *JAMA* **318**, 1241-1249 (2017).
- 17 Rhee, C., Gohil, S. & Klompas, M. Regulatory mandates for sepsis care--reasons for caution. *N Engl J Med* **370**, 1673-1676 (2014).
- 18 Hotchkiss, R. S. *et al.* Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16045 (2016).
- 19 Fleischmann, C. *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* **193**, 259-272 (2016).
- 20 Daviaud, F. *et al.* Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care* **5**, 58 (2015).
- 21 Landelle, C. *et al.* Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* **29**, 1054-1065 (2008).
- 22 van Vught, L. A. *et al.* Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA* **315**, 1469-1479 (2016).
- 23 Sterling, S. A., Puskarich, M. A., Glass, A. F., Guirgis, F. & Jones, A. E. The Impact of the Sepsis-3 Septic Shock Definition on Previously Defined Septic Shock Patients. *Crit Care Med* **45**, 1436-1442 (2017).
- 24 Rubulotta, F. M. *et al.* An international survey: Public awareness and perception of sepsis. *Crit Care Med* **37**, 167-170 (2009).
- 25 Kerrigan, S. W. & Martin-Loeches, I. Public awareness of sepsis is still poor: we need to do more. *Intensive Care Med* **44**, 1771-1773 (2018).
- 26 Levy, M. M. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med* **43**, 3-12 (2015).
- 27 Andreu-Ballester, J. C. *et al.* Association of gammadelta T cells with disease severity and mortality in septic patients. *Clin Vaccine Immunol* **20**, 738-746 (2013).
- 28 Angus, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* **29**, 1303-1310 (2001).
- 29 Torio, C. M. & Andrews, R. M. in *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs* (2006).
- 30 Adrie, C. *et al.* Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J Crit Care* **20**, 46-58 (2005).
- 31 Iwashyna, T. J., Ely, E. W., Smith, D. M. & Langa, K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* **304**, 1787-1794 (2010).

- 32 Liu, Z., Mahale, P. & Engels, E. A. Sepsis and Risk of Cancer Among Elderly Adults in the United States. *Clin Infect Dis* (2018).
- 33 Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* **369**, 840-851 (2013).
- 34 Levy, M. M. *et al.* Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* **12**, 919-924 (2012).
- 35 Page, D. B., Donnelly, J. P. & Wang, H. E. Community-, Healthcare-, and Hospital-Acquired Severe Sepsis Hospitalizations in the University HealthSystem Consortium. *Crit Care Med* **43**, 1945-1951 (2015).
- 36 Vincent, J. L. *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**, 2323-2329 (2009).
- 37 Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* **348**, 1546-1554 (2003).
- 38 Florescu, D. F. & Kalil, A. C. The complex link between influenza and severe sepsis. *Virulence* **5**, 137-142 (2014).
- 39 Fathi, M., Markazi-Moghaddam, N. & Ramezankhani, A. A systematic review on risk factors associated with sepsis in patients admitted to intensive care units. *Aust Crit Care* (2018).
- 40 Barnato, A. E., Alexander, S. L., Linde-Zwirble, W. T. & Angus, D. C. Racial variation in the incidence, care, and outcomes of severe sepsis: analysis of population, patient, and hospital characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 279-284 (2008).
- 41 Mayr, F. B. *et al.* Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA* **303**, 2495-2503 (2010).
- 42 Jamme, M. *et al.* Time Course of Septic Shock in Immunocompromised and Nonimmunocompromised Patients. *Crit Care Med* **45**, 2031-2039 (2017).
- 43 Sriskandan, S. & Altmann, D. M. The immunology of sepsis. *J Pathol* **214**, 211-223 (2008).
- 44 Giamarellos-Bourboulis, E. J. & Opal, S. M. The role of genetics and antibodies in sepsis. *Ann Transl Med* **4**, 328 (2016).
- 45 Barnes, K. C. Genetic determinants and ethnic disparities in sepsis-associated acute lung injury. *Proc Am Thorac Soc* **2**, 195-201 (2005).
- 46 Chung, L. P. & Waterer, G. W. Genetic predisposition to respiratory infection and sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci* **48**, 250-268 (2011).
- 47 Rhodes, A. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* **43**, 304-377 (2017).
- 48 Martin-Loeches, I. *et al.* SEPsIs REcognition and MANagement (SEPREMA survey). *Intensive Care Med* **42**, 477-478 (2016).

- 49 Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* **13**, 260-268 (2013).
- 50 Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **13**, 862-874 (2013).
- 51 Martin, S., Perez, A. & Aldecoa, C. Sepsis and Immunosenescence in the Elderly Patient: A Review. *Front Med (Lausanne)* **4**, 20 (2017).
- 52 Mogensen, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* **22**, 240-273, Table of Contents (2009).
- 53 Rittirsch, D., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* **8**, 776-787 (2008).
- 54 Gerard, C. Complement C5a in the sepsis syndrome--too much of a good thing? *N Engl J Med* **348**, 167-169 (2003).
- 55 Marshall, J. C. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med* **20**, 195-203 (2014).
- 56 Marshall, J. C. Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 391-405 (2003).
- 57 Calvano, S. E. *et al.* A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* **437**, 1032-1037 (2005).
- 58 Panacek, E. A. *et al.* Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med* **32**, 2173-2182 (2004).
- 59 Fisher, C. J., Jr. *et al.* Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* **271**, 1836-1843 (1994).
- 60 Opal, S. M. *et al.* Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med* **25**, 1115-1124 (1997).
- 61 Shakoory, B. *et al.* Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Crit Care Med* **44**, 275-281 (2016).
- 62 Torgersen, C. *et al.* Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg* **108**, 1841-1847 (2009).
- 63 Luyt, C. E. *et al.* Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* **175**, 935-942 (2007).

- 64 Limaye, A. P. *et al.* Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* **300**, 413-422 (2008).
- 65 Ong, D. S. Y. *et al.* Epidemiology of Multiple Herpes Viremia in Previously Immunocompetent Patients With Septic Shock. *Clin Infect Dis* **64**, 1204-1210 (2017).
- 66 Meakins, J. L. *et al.* Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg* **186**, 241-250 (1977).
- 67 Boomer, J. S. *et al.* Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* **306**, 2594-2605 (2011).
- 68 Monneret, G., Venet, F., Pachot, A. & Lepape, A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* **14**, 64-78 (2008).
- 69 Hotchkiss, R. S. *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* **27**, 1230-1251 (1999).
- 70 Hotchkiss, R. S. *et al.* Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J Immunol* **166**, 6952-6963 (2001).
- 71 Hotchkiss, R. S. *et al.* Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* **168**, 2493-2500 (2002).
- 72 Hotchkiss, R. S. *et al.* Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol* **174**, 5110-5118 (2005).
- 73 Venet, F. & Monneret, G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* **14**, 121-137 (2018).
- 74 Guerin, E. *et al.* Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit Care Med* **42**, 2007-2018 (2014).
- 75 Demaret, J. *et al.* Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol* **98**, 1081-1090 (2015).
- 76 Stephan, F. *et al.* Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit Care Med* **30**, 315-322 (2002).
- 77 Kasten, K. R., Muenzer, J. T. & Caldwell, C. C. Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun* **393**, 28-31 (2010).
- 78 Pillay, J. *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* **122**, 327-336 (2012).
- 79 de Kleijn, S. *et al.* IFN-gamma-stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PLoS One* **8**, e72249 (2013).
- 80 Langereis, J. D. *et al.* Spleen-derived IFN-gamma induces generation of PD-L1(+)-suppressive neutrophils during endotoxemia. *J Leukoc Biol* **102**, 1401-1409 (2017).

- 81 Brudecki, L., Ferguson, D. A., McCall, C. E. & El Gazzar, M. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect Immun* **80**, 2026-2034 (2012).
- 82 Albertsmeier, M. *et al.* Monocyte-Dependent Suppression of T-Cell Function in Postoperative Patients and Abdominal Sepsis. *Shock* **48**, 651-656 (2017).
- 83 Mathias, B. *et al.* Human Myeloid-derived Suppressor Cells are Associated With Chronic Immune Suppression After Severe Sepsis/Septic Shock. *Ann Surg* **265**, 827-834 (2016).
- 84 Janols, H. *et al.* A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol* **96**, 685-693 (2014).
- 85 Grimaldi, D. *et al.* 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 (2011).
- 86 Kumar, V. Dendritic cells in sepsis: Potential immunoregulatory cells with therapeutic potential. *Mol Immunol* **101**, 615-626 (2018).
- 87 Poehlmann, H., Schefold, J. C., Zuckermann-Becker, H., Volk, H. D. & Meisel, C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care* **13**, R119 (2009).
- 88 Roquilly, A. *et al.* Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity* **47**, 135-147 e135 (2017).
- 89 Bouras, M., Asehnoune, K. & Roquilly, A. Contribution of Dendritic Cell Responses to Sepsis-Induced Immunosuppression and to Susceptibility to Secondary Pneumonia. *Front Immunol* **9**, 2590 (2018).
- 90 Biswas, S. K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* **30**, 475-487 (2009).
- 91 van Dissel, J. T., van Langevelde, P., Westendorp, R. G., Kwappenberg, K. & Frolich, M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* **351**, 950-953 (1998).
- 92 Zhang, X. & Morrison, D. C. Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* **54**, 444-450 (1993).
- 93 Cavaillon, J. M. & Adib-Conquy, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* **10**, 233 (2006).
- 94 Wolk, K., Docke, W. D., von Baehr, V., Volk, H. D. & Sabat, R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* **96**, 218-223 (2000).

- 95 Shao, R. *et al.* Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3-4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Crit Care* **20**, 124 (2016).
- 96 Guignant, C. *et al.* Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care* **15**, R99 (2011).
- 97 Patera, A. C. *et al.* Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol* **100**, 1239-1254 (2016).
- 98 Uhel, F. *et al.* 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 (2017).
- 99 Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Adib-Conquy, M. & Cavaillon, J. M. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol Med* **18**, 270-285 (2012).
- 100 Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Cavaillon, J. M. & Adib-Conquy, M. Bench-to-bedside review: Natural killer cells in sepsis - guilty or not guilty? *Crit Care* **17**, 235 (2013).
- 101 Venet, F. *et al.* Early Assessment of Leukocyte Alterations at Diagnosis of Septic Shock. *Shock* **34**, 358-363. (2010).
- 102 Forel, J. M. *et al.* Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PLoS One* **7**, e50446 (2012).
- 103 Puente, J. *et al.* In vitro studies of natural killer cell activity in septic shock patients. Response to a challenge with alpha-interferon and interleukin-2. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **31**, 271-275 (1993).
- 104 Souza-Fonseca-Guimaraes, F. *et al.* Toll-like receptors expression and interferon-gamma production by NK cells in human sepsis. *Crit Care* **16**, R206 (2012).
- 105 Georgeson, G. D. *et al.* Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr* **160**, 478-482 (2001).
- 106 Chiche, L. *et al.* Interferon-gamma production by natural killer cells and cytomegalovirus in critically ill patients. *Crit Care Med* **40**, 3162-3169 (2012).
- 107 Hou, H. *et al.* Tim-3 negatively mediates natural killer cell function in LPS-induced endotoxic shock. *PLoS One* **9**, e110585 (2014).
- 108 Shindo, Y. *et al.* Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *J Surg Res* **208**, 33-39 (2017).
- 109 Venet, F. *et al.* Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med* **33**, 2836-2840 (2005).
- 110 Leung, S. *et al.* The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol* **7**, 182-189 (2010).

- 111 Carson, W. F. t. *et al.* Impaired CD4+ T-cell proliferation and effector function correlates with repressive histone methylation events in a mouse model of severe sepsis. *Eur J Immunol* **40**, 998-1010 (2010).
- 112 Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* **15**, 486-499 (2015).
- 113 Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Freeman, G. J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* **8**, 239-245 (2007).
- 114 Monneret, G. *et al.* Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* **31**, 2068-2071 (2003).
- 115 Zanin-Zhorov, A. *et al.* Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* **116**, 2022-2032 (2006).
- 116 Nascimento, D. C. *et al.* IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nat Commun* **8**, 14919 (2017).
- 117 Venet, F. *et al.* Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* **35**, 678-686 (2009).
- 118 Venet, F. *et al.* Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol* **177**, 6540-6547 (2006).
- 119 Li, L. & Wu, C. Y. CD4+ CD25+ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to M tuberculosis antigen ESAT-6. *Blood* **111**, 5629-5636 (2008).
- 120 Condotta, S. A., Cabrera-Perez, J., Badovinac, V. P. & Griffith, T. S. T-cell-mediated immunity and the role of TRAIL in sepsis-induced immunosuppression. *Crit Rev Immunol* **33**, 23-40 (2013).
- 121 Condotta, S. A., Khan, S. H., Rai, D., Griffith, T. S. & Badovinac, V. P. Polymicrobial Sepsis Increases Susceptibility to Chronic Viral Infection and Exacerbates CD8+ T Cell Exhaustion. *J Immunol* **195**, 116-125 (2015).
- 122 Gao, D. N., Yang, Z. X. & Qi, Q. H. Roles of PD-1, Tim-3 and CTLA-4 in immunoregulation in regulatory T cells among patients with sepsis. *Int J Clin Exp Med* **8**, 18998-19005 (2015).
- 123 Chang, K. *et al.* Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit Care* **18**, R3 (2014).
- 124 Choi, Y. J. *et al.* Impaired polyfunctionality of CD8(+) T cells in severe sepsis patients with human cytomegalovirus reactivation. *Exp Mol Med* **49**, e382 (2017).

- 125 Hotchkiss, R. S. & Nicholson, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* **6**, 813-822 (2006).
- 126 Faivre, V., Lukaszewicz, A. C. & Payen, D. Downregulation of Blood Monocyte HLA-DR in ICU Patients Is Also Present in Bone Marrow Cells. *PLoS One* **11**, e0164489 (2016).
- 127 Skirecki, T. *et al.* Early severe impairment of hematopoietic stem and progenitor cells from the bone marrow caused by CLP sepsis and endotoxemia in a humanized mice model. *Stem Cell Res Ther* **6**, 142 (2015).
- 128 Kong, Y. *et al.* Sepsis-Induced Thymic Atrophy Is Associated with Defects in Early Lymphopoiesis. *Stem Cells* **34**, 2902-2915 (2016).
- 129 Linder, A. *et al.* 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 (2014).
- 130 Wang, J. F. *et al.* Up-regulation of Programmed Cell Death 1 Ligand 1 on Neutrophils May Be Involved in Sepsis-induced Immunosuppression: An Animal Study and a Prospective Case-control Study. *Anesthesiology* **122**, 852-863 (2015).
- 131 Guisset, O. *et al.* Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med* **33**, 148-152 (2007).
- 132 Landelle, C. *et al.* Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* **36**, 1859-1866 (2010).
- 133 Monneret, G. *et al.* Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* **32**, 1175-1183 (2006).
- 134 Wesche-Soldato, D. E., Swan, R. Z., Chung, C. S. & Ayala, A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* **8**, 493-500 (2007).
- 135 Shubin, N. J. *et al.* BTLA expression contributes to septic morbidity and mortality by inducing innate inflammatory cell dysfunction. *J Leukoc Biol* **92**, 593-603 (2012).
- 136 Shubin, N. J., Monaghan, S. F., Heffernan, D. S., Chung, C. S. & Ayala, A. B and T lymphocyte attenuator expression on CD4+ T-cells associates with sepsis and subsequent infections in ICU patients. *Crit Care* **17**, R276 (2013).
- 137 Liu, Q., An, L., Qi, Z., Zhao, Y. & Li, C. Increased Expression of Programmed Cell Death-1 in Regulatory T Cells of Patients with Severe Sepsis and Septic Shock: An Observational Clinical Study. *Scand J Immunol* **86**, 408-417 (2017).
- 138 Gogos, C. A., Drosou, E., Bassaris, H. P. & Skoutelis, A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* **181**, 176-180 (2000).

- 139 Demaret, J. *et al.* Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med* **40**, 1089-1096 (2014).
- 140 Delwarde, B. *et al.* Low Interleukin-7 Receptor Messenger RNA Expression Is Independently Associated With Day 28 Mortality in Septic Shock Patients. *Crit Care Med* **46**, 1739-1746 (2018).
- 141 Hotchkiss, R. S. & Moldawer, L. L. Parallels between cancer and infectious disease. *N Engl J Med* **371**, 380-383 (2014).
- 142 Patil, N. K., Bohannon, J. K. & Sherwood, E. R. Immunotherapy: A promising approach to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Pharmacol Res* **111**, 688-702 (2016).
- 143 Morre, M. & Beq, S. Interleukin-7 and immune reconstitution in cancer patients: a new paradigm for dramatically increasing overall survival. *Target Oncol* **7**, 55-68 (2012).
- 144 Tredan, O. *et al.* ELYPSE-7: a randomized placebo-controlled phase IIa trial with CYT107 exploring the restoration of CD4+ lymphocyte count in lymphopenic metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol* **26**, 1353-1362 (2015).
- 145 Patel, A., Patel, J. & Ikwuagwu, J. A case of progressive multifocal leukoencephalopathy and idiopathic CD4+ lymphocytopenia. *J Antimicrob Chemother* **65**, 2697-2698 (2010).
- 146 Levy, Y. *et al.* Effects of recombinant human interleukin 7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study. *Clin Infect Dis* **55**, 291-300 (2012).
- 147 Perales, M. A. *et al.* Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **120**, 4882-4891 (2012).
- 148 Venet, F. *et al.* IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol* **189**, 5073-5081 (2012).
- 149 Venet, F. *et al.* IL-7 Restores T Lymphocyte Immunometabolic Failure in Septic Shock Patients through mTOR Activation. *J Immunol* **199**, 1606-1615 (2017).
- 150 Unsinger, J. *et al.* Sepsis-induced apoptosis leads to active suppression of delayed-type hypersensitivity by CD8+ regulatory T cells through a TRAIL-dependent mechanism. *J Immunol* **184**, 6766-6772 (2010).
- 151 Unsinger, J. *et al.* Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J Infect Dis* **206**, 606-616 (2012).
- 152 Kasten, K. R. *et al.* Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infect Immun* **78**, 4714-4722 (2010).
- 153 Francois, B. *et al.* Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* **3**, e98960 (2018).

- 154 Patil, N. K., Guo, Y., Luan, L. & Sherwood, E. R. Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis. *Int J Mol Sci* **18** (2017).
- 155 Docke, W. D. *et al.* Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* **3**, 678-681 (1997).
- 156 Nalos, M. *et al.* Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* **185**, 110-112 (2012).
- 157 Delsing, C. E. *et al.* Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect Dis* **14**, 166 (2014).
- 158 Leentjens, J. *et al.* Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 838-845 (2012).
- 159 Root, R. K. *et al.* Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. *Crit Care Med* **31**, 367-373 (2003).
- 160 Nelson, S. *et al.* A randomized controlled trial of filgrastim as an adjunct to antibiotics for treatment of hospitalized patients with community-acquired pneumonia. CAP Study Group. *J Infect Dis* **178**, 1075-1080 (1998).
- 161 Meisel, C. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 640-648 (2009).
- 162 Hall, M. W. *et al.* Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* **37**, 525-532 (2011).
- 163 Michot, J. M. *et al.* Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer* **54**, 139-148 (2016).
- 164 Venet, F., Lukaszewicz, A. C., Payen, D., Hotchkiss, R. & Monneret, G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* **25**, 477-483 (2013).
- 165 Schaack, D., Siegler, B. H., Tamulyte, S., Weigand, M. A. & Uhle, F. The immunosuppressive face of sepsis early on intensive care unit-A large-scale microarray meta-analysis. *PLoS One* **13**, e0198555 (2018).
- 166 Seshadri, A. *et al.* Phenotyping the Immune Response to Trauma: A Multiparametric Systems Immunology Approach. *Crit Care Med* **45**, 1523-1530 (2017).
- 167 Prieto, J. M. B. & Felipe, M. J. B. Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **54**, 38-44 (2017).
- 168 Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **13**, 118-132 (2013).

- 169 Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H. & Dorshkind, K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* **7**, 293-301 (2006).
- 170 Herzenberg, L. A. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev* **175**, 9-22 (2000).
- 171 Wardemann, H., Boehm, T., Dear, N. & Carsetti, R. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med* **195**, 771-780 (2002).
- 172 Melchers, F. *et al.* Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol Rev* **175**, 33-46 (2000).
- 173 Cambier, J. C., Gauld, S. B., Merrell, K. T. & Vilen, B. J. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* **7**, 633-643 (2007).
- 174 Bemar, M. Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *J Biomed Res* **29**, 264-284 (2015).
- 175 Martin, V. G. *et al.* Transitional B Cells in Early Human B Cell Development - Time to Revisit the Paradigm? *Front Immunol* **7**, 546 (2016).
- 176 Melchers, F. Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest* **125**, 2203-2210 (2015).
- 177 Aziz, M., Holodick, N. E., Rothstein, T. L. & Wang, P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol Res* **63**, 153-166 (2015).
- 178 Chousterman, B. G. & Swirski, F. K. Innate response activator B cells: origins and functions. *Int Immunol* **27**, 537-541 (2015).
- 179 Weber, G. F. *et al.* Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* **347**, 1260-1265 (2015).
- 180 Wang, M. *et al.* Interleukin-3/granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor promotes stem cell expansion, monocytosis, and atheroma macrophage burden in mice with hematopoietic ApoE deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 976-984 (2014).
- 181 Defrance, T., Taillardet, M. & Genestier, L. T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol* **23**, 330-336 (2011).
- 182 Deenick, E. K. & Ma, C. S. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology* **134**, 361-367 (2011).
- 183 Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 149-159 (2015).
- 184 Schneider, P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **17**, 282-289 (2005).
- 185 Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 959-971 (2013).

- 186 Quach, T. D. *et al.* Distinctions among Circulating Antibody-Secreting Cell Populations, Including B-1 Cells, in Human Adult Peripheral Blood. *J Immunol* **196**, 1060-1069 (2016).
- 187 Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. & Corcoran, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 160-171 (2015).
- 188 Wolf, S. D., Dittel, B. N., Hardardottir, F. & Janeway, C. A., Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* **184**, 2271-2278 (1996).
- 189 Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* **3**, 944-950 (2002).
- 190 Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765 (2001).
- 191 Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N. & Londei, M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* **197**, 489-501 (2003).
- 192 Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S. & Bhan, A. K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* **16**, 219-230 (2002).
- 193 Yanaba, K. *et al.* A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* **28**, 639-650 (2008).
- 194 Evans, J. G. *et al.* Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* **178**, 7868-7878 (2007).
- 195 Blair, P. A. *et al.* Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol* **182**, 3492-3502 (2009).
- 196 Iwata, Y. *et al.* Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **117**, 530-541 (2011).
- 197 Yang, M., Du, C., Wang, Y. & Liu, J. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) regulatory B cells are associated with insulin resistance in type I Hashimoto's thyroiditis in Chinese females. *Exp Ther Med* **14**, 3887-3893 (2017).
- 198 Gieni, R. S., Umetsu, D. T. & DeKruyff, R. H. Ly1- (CD5-) B cells produce interleukin (IL)-10. *Cell Immunol* **175**, 164-170 (1997).
- 199 Ding, Q. *et al.* Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J Clin Invest* **121**, 3645-3656 (2011).
- 200 Weber, M. *et al.* Donor and host B cell-derived IL-10 contributes to suppression of graft-versus-host disease. *Eur J Immunol* **44**, 1857-1865 (2014).

- 201 Zhang, Y. *et al.* CD19⁺ Tim-1⁺ B cells are decreased and negatively correlated with disease severity in Myasthenia Gravis patients. *Immunol Res* **64**, 1216-1224 (2016).
- 202 Xue, H. *et al.* Overrepresentation of IL-10-Expressing B Cells Suppresses Cytotoxic CD4⁺ T Cell Activity in HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* **11**, e0154815 (2016).
- 203 Gu, X. L. *et al.* Tim-1(+) B cells suppress T cell interferon-gamma production and promote Foxp3 expression, but have impaired regulatory function in coronary artery disease. *APMIS* **125**, 872-879 (2017).
- 204 Aravena, O. *et al.* TIM-1 defines a human regulatory B cell population that is altered in frequency and function in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* **19**, 8 (2017).
- 205 Kishimoto, W. *et al.* Expression of Tim-1 in primary CNS lymphoma. *Cancer Med* **5**, 3235-3245 (2016).
- 206 Griffin, D. O. & Rothstein, T. L. Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. *Mol Med* **18**, 1003-1008 (2012).
- 207 Sun, J. *et al.* Transcriptomics Identify CD9 as a Marker of Murine IL-10-Competent Regulatory B Cells. *Cell Rep* **13**, 1110-1117 (2015).
- 208 Braza, F. *et al.* A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. *Allergy* **70**, 1421-1431 (2015).
- 209 Wilson, M. S. *et al.* Helminth-induced CD19⁺CD23^{hi} B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *Eur J Immunol* **40**, 1682-1696 (2010).
- 210 Shen, P. *et al.* IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* **507**, 366-370 (2014).
- 211 Niedbala, W. *et al.* IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol* **37**, 3021-3029 (2007).
- 212 Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566-569 (2007).
- 213 Wang, R. X. *et al.* Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* **20**, 633-641 (2014).
- 214 Wang, K. *et al.* Aberrant frequency of IL-35 producing B cells in colorectal cancer patients. *Cytokine* **102**, 206-210 (2018).
- 215 Wang, K., Liu, J. & Li, J. IL-35-producing B cells in gastric cancer patients. *Medicine (Baltimore)* **97**, e0710 (2018).
- 216 Tarique, M., Saini, C., Naqvi, R. A., Khanna, N. & Rao, D. N. Increased IL-35 producing Tregs and CD19(+)IL-35(+) cells are associated with disease progression in leprosy patients. *Cytokine* **91**, 82-88 (2017).

- 217 Fonseca-Camarillo, G., Furuzawa-Carballeda, J. & Yamamoto-Furusho, J. K. Interleukin 35 (IL-35) and IL-37: Intestinal and peripheral expression by T and B regulatory cells in patients with Inflammatory Bowel Disease. *Cytokine* **75**, 389-402 (2015).
- 218 Tian, J. *et al.* Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* **167**, 1081-1089 (2001).
- 219 Parekh, V. V. *et al.* B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8⁺ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol* **170**, 5897-5911 (2003).
- 220 Shimomura, Y. *et al.* Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. *Int Immunol* **20**, 729-737 (2008).
- 221 Lee, J. H. *et al.* Allergen-specific transforming growth factor-beta-producing CD19⁺CD5⁺ regulatory B-cell (Br3) responses in human late eczematous allergic reactions to cow's milk. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 441-449 (2011).
- 222 Kessel, A. *et al.* Human CD19⁽⁺⁾CD25^(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4⁽⁺⁾ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev* **11**, 670-677 (2012).
- 223 Bermejo, D. A. *et al.* Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORgammat and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol* **14**, 514-522 (2013).
- 224 Kaku, H., Cheng, K. F., Al-Abed, Y. & Rothstein, T. L. A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J Immunol* **193**, 5904-5913 (2014).
- 225 Saze, Z. *et al.* Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood* **122**, 9-18 (2013).
- 226 Figueiro, F. *et al.* Phenotypic and functional characteristics of CD39^(high) human regulatory B cells (Breg). *Oncoimmunology* **5**, e1082703 (2016).
- 227 Ziebart, A. *et al.* The influence of chemotherapy on adenosine-producing B cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **9**, 5834-5847 (2018).
- 228 Xu, L. *et al.* Impairment of Granzyme B-Producing Regulatory B Cells Correlates with Exacerbated Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* **8**, 768 (2017).
- 229 Zhu, J. *et al.* Granzyme B producing B-cells in renal transplant patients. *Clin Immunol* **184**, 48-53 (2017).
- 230 Kotb, A. *et al.* Elevated granzyme B⁽⁺⁾ B-cell level in SIV-infection correlate with viral load and low CD4 T-cell count. *Immunol Cell Biol* **95**, 316-320 (2017).

- 231 Kaltenmeier, C. *et al.* CD4+ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients. *J Immunol* **194**, 3768-3777 (2015).
- 232 Lindner, S. *et al.* Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res* **73**, 2468-2479 (2013).
- 233 Ray, A., Basu, S., Williams, C. B., Salzman, N. H. & Dittel, B. N. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol* **188**, 3188-3198 (2012).
- 234 Natarajan, P. *et al.* Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5+, express TGF-beta, and co-localize with CD4+Foxp3+ T cells. *Mucosal Immunol* **5**, 691-701 (2012).
- 235 Lee, K. M. *et al.* TGF-beta-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur J Immunol* **44**, 1728-1736 (2014).
- 236 Said, S. S., Barut, G. T., Mansur, N., Korkmaz, A. & Sayi-Yazgan, A. Bacterially activated B-cells drive T cell differentiation towards Tr1 through PD-1/PD-L1 expression. *Mol Immunol* **96**, 48-60 (2018).
- 237 Good-Jacobson, K. L. *et al.* PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* **11**, 535-542 (2010).
- 238 Hams, E. *et al.* Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. *J Immunol* **186**, 5648-5655 (2011).
- 239 Sage, P. T., Francisco, L. M., Carman, C. V. & Sharpe, A. H. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat Immunol* **14**, 152-161 (2013).
- 240 Linterman, M. A. *et al.* Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* **17**, 975-982 (2011).
- 241 Khan, A. R. *et al.* PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun* **6**, 5997 (2015).
- 242 Lopez-Medina, M., Carrillo-Martin, I., Leyva-Rangel, J., Alpuche-Aranda, C. & Ortiz-Navarrete, V. Salmonella impairs CD8 T cell response through PD-1: PD-L axis. *Immunobiology* **220**, 1369-1380 (2015).
- 243 Schaut, R. G. *et al.* Regulatory IgDhi B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. *J Immunol* **196**, 4100-4109 (2016).
- 244 Xiao, X. *et al.* PD-1hi Identifies a Novel Regulatory B-cell Population in Human Hepatoma That Promotes Disease Progression. *Cancer Discov* **6**, 546-559 (2016).

- 245 Siewe, B. *et al.* Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro. *J Leukoc Biol* **93**, 811-818 (2013).
- 246 Guan, H. *et al.* PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer. *Sci Rep* **6**, 35651 (2016).
- 247 Montandon, R. *et al.* Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E2199-2208 (2013).
- 248 Lundy, S. K. & Fox, D. A. Reduced Fas ligand-expressing splenic CD5+ B lymphocytes in severe collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* **11**, R128 (2009).
- 249 Lundy, S. K., Berlin, A. A., Martens, T. F. & Lukacs, N. W. Deficiency of regulatory B cells increases allergic airway inflammation. *Inflamm Res* **54**, 514-521 (2005).
- 250 Wang, K. *et al.* TLR4 supports the expansion of FasL(+)CD5(+)CD1d(hi) regulatory B cells, which decreases in contact hypersensitivity. *Mol Immunol* **87**, 188-199 (2017).
- 251 Mishra, R., Panda, S. K., Sahoo, P. K., Bal, M. S. & Satapathy, A. K. Increased Fas ligand expression of peripheral B-1 cells correlated with CD4(+) T-cell apoptosis in filarial-infected patients. *Parasite Immunol* **39** (2017).
- 252 Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Matsushita, T., Tsubata, T. & Tedder, T. F. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol* **182**, 7459-7472 (2009).
- 253 Yoshizaki, A. *et al.* Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* **491**, 264-268 (2012).
- 254 Poe, J. C. *et al.* Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice. *PLoS One* **6**, e22464 (2011).
- 255 Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M. & Tedder, T. F. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest* **118**, 3420-3430 (2008).
- 256 Lampropoulou, V. *et al.* TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* **180**, 4763-4773 (2008).
- 257 Brummel, R. & Lenert, P. Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **174**, 2429-2434 (2005).
- 258 Neves, P. *et al.* Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* **33**, 777-790 (2010).
- 259 Maseda, D. *et al.* Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo. *J Immunol* **188**, 1036-1048 (2012).

- 260 Fillatreau, S. Novel regulatory functions for Toll-like receptor-activated B cells during intracellular bacterial infection. *Immunol Rev* **240**, 52-71 (2011).
- 261 Yang, M. *et al.* Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. *J Immunol* **184**, 3321-3325 (2010).
- 262 Zhang, Y. *et al.* The Unknown Aspect of BAFF: Inducing IL-35 Production by a CD5(+)CD1d(hi)FcγRIIb(hi) Regulatory B-Cell Subset in Lupus. *J Invest Dermatol* **137**, 2532-2543 (2017).
- 263 Tedder, T. F. & Leonard, W. J. Autoimmunity: regulatory B cells--IL-35 and IL-21 regulate the regulators. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 452-453 (2014).
- 264 Sattler, S. *et al.* IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J Autoimmun* **50**, 107-122 (2014).
- 265 Rosser, E. C. *et al.* Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1β and interleukin-6 production. *Nat Med* **20**, 1334-1339 (2014).
- 266 Kalampokis, I., Yoshizaki, A. & Tedder, T. F. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther* **15 Suppl 1**, S1 (2013).
- 267 Durand, J. *et al.* Regulatory B Cells with a Partial Defect in CD40 Signaling and Overexpressing Granzyme B Transfer Allograft Tolerance in Rodents. *J Immunol* **195**, 5035-5044 (2015).
- 268 Papp, G., Gyimesi, E., Szabo, K., Zold, E. & Zeher, M. Increased IL-21 Expression Induces Granzyme B in Peripheral CD5(+) B Cells as a Potential Counter-Regulatory Effect in Primary Sjogren's Syndrome. *Mediators Inflamm* **2016**, 4328372 (2016).
- 269 Shen, M. *et al.* A novel MDSC-induced PD-1(-)PD-L1(+) B-cell subset in breast tumor microenvironment possesses immuno-suppressive properties. *Oncoimmunology* **7**, e1413520 (2018).
- 270 Zhao, Y. *et al.* Regulatory B cells induced by pancreatic cancer cell-derived interleukin-18 promote immune tolerance via the PD-1/PD-L1 pathway. *Oncotarget* **9**, 14803-14814 (2018).
- 271 Tang, Y. *et al.* BIP induces mice CD19(hi) regulatory B cells producing IL-10 and highly expressing PD-L1, FasL. *Mol Immunol* **69**, 44-51 (2016).
- 272 Wong, S. H., Barlow, J. L., Nabarro, S., Fallon, P. G. & McKenzie, A. N. Tim-1 is induced on germinal centre B cells through B-cell receptor signalling but is not essential for the germinal centre response. *Immunology* **131**, 77-88 (2010).
- 273 Yeung, M. Y. *et al.* TIM-1 signaling is required for maintenance and induction of regulatory B cells. *Am J Transplant* **15**, 942-953 (2015).
- 274 Teichmann, L. L. *et al.* B cell-derived IL-10 does not regulate spontaneous systemic autoimmunity in MRL.Fas(lpr) mice. *J Immunol* **188**, 678-685 (2012).

- 275 Matsumoto, M. *et al.* Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* **41**, 1040-1051 (2014).
- 276 Shalapour, S. *et al.* Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature* **521**, 94-98 (2015).
- 277 Lino, A. C. *et al.* LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. *Immunity* **49**, 120-133 e129 (2018).
- 278 Hartung, H. P. & Kieseier, B. C. Atacicept: targeting B cells in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* **3**, 205-216 (2010).
- 279 Rangaswamy, U. S. & Speck, S. H. Murine gammaherpesvirus M2 protein induction of IRF4 via the NFAT pathway leads to IL-10 expression in B cells. *PLoS Pathog* **10**, e1003858 (2014).
- 280 Wootla, B. *et al.* Hydrolysis of coagulation factors by circulating IgG is associated with a reduced risk for chronic allograft nephropathy in renal transplanted patients. *J Immunol* **180**, 8455-8460 (2008).
- 281 Lacroix-Desmazes, S. *et al.* High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4109-4113 (2005).
- 282 Cretney, E. *et al.* The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol* **12**, 304-311 (2011).
- 283 Mauri, C. & Blair, P. A. The incognito journey of a regulatory B cell. *Immunity* **41**, 878-880 (2014).
- 284 Noh, J., Choi, W. S., Noh, G. & Lee, J. H. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune Netw* **10**, 247-249 (2010).
- 285 Vadasz, Z. *et al.* The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *J Immunol Res* **2015**, 254245 (2015).
- 286 Zhang, Y. *et al.* Altered expression of transcription factors IRF4 and IRF8 in peripheral blood B cells is associated with clinical severity and circulating plasma cells frequency in patients with myasthenia gravis. *Autoimmunity* **51**, 126-134 (2018).
- 287 Kelly-Scumpia, K. M. *et al.* B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *J Exp Med* **208**, 1673-1682 (2011).
- 288 Rauch, P. J. *et al.* Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* **335**, 597-601 (2012).
- 289 Liu, J. *et al.* Fcmicro Receptor Promotes the Survival and Activation of Marginal Zone B Cells and Protects Mice against Bacterial Sepsis. *Front Immunol* **9**, 160 (2018).
- 290 Ditschkowski, M. *et al.* Reduced B cell HLA-DR expression and natural killer cell counts in patients prone to sepsis after injury. *Eur J Surg* **165**, 1129-1133 (1999).

- 291 Frattari, A. *et al.* Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in critical patients at ICU admission: A preliminary investigation of their role in the prediction of sepsis during ICU stay. *Int J Immunopathol Pharmacol* **32**, 2058738418792310 (2018).
- 292 DiPiro, J. T., Hamilton, R. G., Howdieshell, T. R., Adkinson, N. F., Jr. & Mansberger, A. R., Jr. Total IgE in plasma is elevated after traumatic injury and is associated with sepsis syndrome. *Ann Surg* **215**, 460-465; discussion 465-466 (1992).
- 293 Wilmore, J. R. *et al.* Commensal Microbes Induce Serum IgA Responses that Protect against Polymicrobial Sepsis. *Cell Host Microbe* **23**, 302-311 e303 (2018).
- 294 Shankar-Hari, M. *et al.* Activation-Associated Accelerated Apoptosis of Memory B Cells in Critically Ill Patients With Sepsis. *Crit Care Med* **45**, 875-882 (2017).
- 295 Monserrat, J. *et al.* Early alterations of B cells in patients with septic shock. *Crit Care* **17**, R105 (2013).
- 296 Krautz, C. *et al.* Reduced circulating B cells and plasma IgM levels are associated with decreased survival in sepsis - A meta-analysis. *J Crit Care* **45**, 71-75 (2018).
- 297 Aziz, M. *et al.* B-1a cells protect mice from sepsis-induced acute lung injury. *Mol Med* **24**, 26 (2018).
- 298 Suzuki, K. *et al.* Reduced Immunocompetent B Cells and Increased Secondary Infection in Elderly Patients With Severe Sepsis. *Shock* **46**, 270-278 (2016).
- 299 Moir, S. *et al.* Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* **205**, 1797-1805 (2008).
- 300 Wilson, J. K., Zhao, Y., Singer, M., Spencer, J. & Shankar-Hari, M. Lymphocyte subset expression and serum concentrations of PD-1/PD-L1 in sepsis - pilot study. *Crit Care* **22**, 95 (2018).
- 301 Harada, Y. *et al.* Identification of early plasma cells in peripheral blood and their clinical significance. *Br J Haematol* **92**, 184-191 (1996).
- 302 Shtalrid, M., Shvidel, L. & Vorst, E. Polyclonal reactive peripheral blood plasmacytosis mimicking plasma cell leukemia in a patient with Staphylococcal sepsis. *Leuk Lymphoma* **44**, 379-380 (2003).
- 303 Shankar-Hari, M. *et al.* Endogenous IgG hypogammaglobulinaemia in critically ill adults with sepsis: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* **41**, 1393-1401 (2015).
- 304 Giamarellos-Bourboulis, E. J. *et al.* Kinetics of circulating immunoglobulin M in sepsis: relationship with final outcome. *Crit Care* **17**, R247 (2013).
- 305 Mohr, A. *et al.* Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. *Eur J Immunol* **42**, 341-352 (2012).

- 306 Pan, X., Ji, Z. & Xue, J. Percentage of Peripheral CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Regulatory B Cells in Neonatal Sepsis Patients and Its Functional Implication. *Med Sci Monit* **22**, 2374-2378 (2016).
- 307 Li, S. *et al.* Marked elevation of circulating CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi} transitional B cells give protection against neonatal sepsis. *Pediatr Neonatol* **59**, 296-304 (2018).
- 308 Aziz, M., Holodick, N. E., Rothstein, T. L. & Wang, P. B-1a Cells Protect Mice from Sepsis: Critical Role of CREB. *J Immunol* **199**, 750-760 (2017).
- 309 Kulkarni, U., Herrmenau, C., Win, S. J., Bauer, M. & Kamradt, T. IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells. *PLoS One* **13**, e0192304 (2018).
- 310 Efron, P. A., Mohr, A. M., Moore, F. A. & Moldawer, L. L. The future of murine sepsis and trauma research models. *J Leukoc Biol* **98**, 945-952 (2015).
- 311 Deitch, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* **24 Suppl 1**, 19-23 (2005).
- 312 Lewis, A. J., Lee, J. S. & Rosengart, M. R. Translational Sepsis Research: Spanning the Divide. *Crit Care Med* **46**, 1497-1505 (2018).
- 313 Morbach, H., Eichhorn, E. M., Liese, J. G. & Girschick, H. J. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* **162**, 271-279 (2010).
- 314 Mei, H. E. *et al.* Plasmablasts With a Mucosal Phenotype Contribute to Plasmacytosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* **69**, 2018-2028 (2017).
- 315 Korporal-Kuhnke, M., Haas, J., Schwarz, A., Jarius, S. & Wildemann, B. Plasmacytosis is a common immune signature in patients with MMN and CIDP and responds to treatment with IVIg. *J Neuroimmunol* **278**, 60-68 (2015).
- 316 Mori, I. *et al.* Prominent plasmacytosis following intravenous immunoglobulin correlates with clinical improvement in Guillain-Barre syndrome. *PLoS One* **3**, e2109 (2008).
- 317 Witzig, T. E. *et al.* Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood* **88**, 1780-1787 (1996).
- 318 Mina, R., D'Agostino, M., Cerrato, C., Gay, F. & Palumbo, A. Plasma cell leukemia: update on biology and therapy. *Leuk Lymphoma* **58**, 1538-1547 (2017).
- 319 Nagoshi, H. *et al.* Clinical manifestation of angioimmunoblastic T-cell lymphoma with exuberant plasmacytosis. *Int J Hematol* **98**, 366-374 (2013).
- 320 Ahsanuddin, A. N., Brynes, R. K. & Li, S. Peripheral blood polyclonal plasmacytosis mimicking plasma cell leukemia in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma: report of 3 cases and review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol* **4**, 416-420 (2011).
- 321 Carpenter, E. L. *et al.* Collapse of the CD27⁺ B-cell compartment associated with systemic plasmacytosis in patients with advanced melanoma and other cancers. *Clin Cancer Res* **15**, 4277-4287 (2009).

- 322 Thai, K. T. *et al.* High incidence of peripheral blood plasmacytosis in patients with dengue virus infection. *Clin Microbiol Infect* **17**, 1823-1828 (2011).
- 323 Wada, T. *et al.* Reactive peripheral blood plasmacytosis in a patient with acute hepatitis A. *Int J Hematol* **85**, 191-194 (2007).
- 324 Wada, T., Iwata, Y., Kamikawa, Y., Wada, T. & Yachie, A. Peripheral Blood Plasmacytosis in Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome. *Jpn J Infect Dis* **70**, 470-471 (2017).
- 325 Koduri, P. R. & Naides, S. J. Transient blood plasmacytosis in parvovirus B19 infection: a report of two cases. *Ann Hematol* **72**, 49-51 (1996).
- 326 Lee, F. E., Falsey, A. R., Halliley, J. L., Sanz, I. & Walsh, E. E. Circulating antibody-secreting cells during acute respiratory syncytial virus infection in adults. *J Infect Dis* **202**, 1659-1666 (2010).
- 327 Munoz, J., Hughes, A. & Guo, Y. Mucormycosis-associated intracranial hemorrhage. *Blood Coagul Fibrinolysis* **24**, 100-101 (2013).
- 328 Okabe, M., Hirono, K., Tamura, K., Ichida, F. & Kanegane, H. Reactive peripheral blood plasmacytosis in Kawasaki disease. *Pediatr Int* **60**, 884-885 (2018).
- 329 Moon, Y. *et al.* Klebsiella pneumoniae associated extreme plasmacytosis. *Infect Chemother* **45**, 435-440 (2013).
- 330 Fink, K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front Immunol* **3**, 78 (2012).
- 331 Jegou, G., Bataille, R. & Pellat-Deceunynck, C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* **97**, 1817-1822 (2001).
- 332 Rol, M. L. *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* **7**, e015734 (2017).
- 333 Sanchez, E. *et al.* Soluble B-Cell Maturation Antigen Mediates Tumor-Induced Immune Deficiency in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* **22**, 3383-3397 (2016).
- 334 Sanchez, E. *et al.* The Role of B-Cell Maturation Antigen in the Biology and Management of, and as a Potential Therapeutic Target in, Multiple Myeloma. *Target Oncol* **13**, 39-47 (2018).
- 335 Laurent, S. A. *et al.* gamma-Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. *Nat Commun* **6**, 7333 (2015).
- 336 Lendak, D. F. *et al.* APRIL and sTACI could be predictors of multiorgan dysfunction syndrome in sepsis. *Virulence* **9**, 946-953 (2018).
- 337 Restagno, D. *et al.* Mice Survival and Plasmatic Cytokine Secretion in a "Two Hit" Model of Sepsis Depend on Intratracheal Pseudomonas Aeruginosa Bacterial Load. *PLoS One* **11**, e0162109 (2016).