



HAL
open science

Origine et rôles des cellules myéloïdes suppressives dans le sepsis

Emilie Lereclus

► **To cite this version:**

Emilie Lereclus. Origine et rôles des cellules myéloïdes suppressives dans le sepsis. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2018. Français. NNT : 2018LIMO0060 . tel-02440666

HAL Id: tel-02440666

<https://theses.hal.science/tel-02440666v1>

Submitted on 15 Jan 2020

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.

Université de Limoges
Ecole Doctorale Sciences Biologiques et Santé (ED615)
UMR 7276 Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations
UMR 1092 Anti-infectieux : supports moléculaires des résistances et innovations
thérapeutiques

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Immunologie et Infectiologie

Présentée et soutenue par
LERECLUS Emilie

Le 13 décembre 2018

Origine et rôles des cellules myéloïdes suppressives dans le sepsis

Thèse dirigée par le Professeur Sophie ALAIN et le Professeur Jean FEUILLARD

JURY :

Rapporteurs

Mme. Karin TARTE, PU-PH, UMR INSERM U1236, Université de Rennes 1

M. Guillaume MONNERET, PU-PH, EA 7426, Université Claude Bernard Lyon 1

Examineurs

M. Mikael ROUSSEL, PH, UMR INSERM U1236, Université de Rennes 1

Mme. Sophie ALAIN, PU-PH, UMR INSERM 1092, Université de Limoges

M. Jean FEUILLARD, PU-PH, UMR CNRS 7276, Université de Limoges

M. Bruno FRANÇOIS, PH, UMR INSERM 1092, Université de Limoges





“Forever trusting who we are, and nothing else matters”

James Hetfield



Remerciements

Par ces quelques lignes, je voudrais exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'oublier personne...

Je commencerai par remercier le Pr Jean Feuillard, pour m'avoir encadrée au cours de ces trois années. Merci Jean de m'avoir confié ce travail, mais aussi guidée et encouragée tout le long.

De la même façon, je vais remercier le Pr Sophie Alain pour son co-encadrement. Merci de m'avoir fait confiance en me donnant ce projet, et de m'avoir aidée avec autant d'enthousiasme lorsque j'en ai eu besoin.

Je remercie sincèrement le Pr Karin Tarte, le Pr Guillaume Monneret, le Dr Mikael Roussel et le Dr Bruno François pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs et examinateurs. J'espère que ce manuscrit retiendra leur intérêt et que sa lecture leur sera agréable.

Je voudrais maintenant adresser ma gratitude un peu différemment à Robin! Je ne pourrais jamais assez remercier ton aide au cours de ces trois dernières années. Si j'en suis là aujourd'hui c'est principalement grâce à toi et j'admire la patience que tu as eu pour me guider. Très sincèrement, tu as été un mentor au top ! Ceci dit, je passerai rapidement sur ton humour tout à fait subjectif, mais dont rassure-toi je ne me suis pas lassée ^^ !

Je tiens à remercier tout le service de Réanimation et principalement, Bruno et Thomas, grâce à qui j'ai pu réaliser la partie clinique de ce travail, mais aussi un grand merci pour l'aide qu'ils m'ont apporté pour l'écriture de ce mémoire. Merci à Ana, pour son aide ainsi que pour les excellents moments à Amsterdam ! Je voudrais aussi faire part ici, de ma reconnaissance à toute l'équipe du CIC, avec qui j'ai eu plaisir de travailler !

Je tiens à remercier l'ensemble de la team JF, Christelle, Oussama, Cathy pour leurs précieux conseils, merci Chantal pour tous tes petits potins, merci à Sophie ma nouvelle coloc', à Nathalie et Ahmad, ainsi qu'à Lilian, le dernier Jedi, il ne reste plus que toi grand! Je pense également à ma chère amie et collègue du *dream office**, Racha.

Merci à toute l'équipe d'Hémato du CHU, et en particulier le trio CMF : Patricia, Anne et Stéphane vos conversations parfois amphibologiques mais tant divertissantes vont assurément me manquer ! Anne, je tiens à remercier ton oreille attentive ces derniers mois, tu as été parfois un peu comme une deuxième maman. Je salue également Estelle, Marjo, Elodie, Patrick, et tous ceux que j'ai pu oublier!



Un grand merci à Michel Cogné pour son accueil au sein de son UMR, ainsi qu'à toute sa team, avec une pensée particulière aux membres du club Mots Fléchés du midi ! Merci à Stéphan, Claire, Myou, Jeanne, Tiffany, les San/Cen-drine pour leur aide et leurs agréables conversations ! Merci à ma copine Marion, tu es si loin au 2^{ème}, mais ça ne nous a pas empêché de faire les potins tous les midis ! Merci à Marine, Cookie, Bastien, Steven, Aude, et tous les autres pour les petites soirées passées avec eux autour d'un verre, parfois même deux...

Je remercie également toute l'équipe du 3ème du CBRS, la team Viro et la team Bactério ! Merci à Chloé, Claire, Déborah, Michaël, Gaëtan, Yohann, Thomas et tous les autres pour leur aide, leur accueil plus que chaleureux ! Mélissa, Dorian et Guillaume, j'ai beaucoup apprécié votre patience et vos coups de main pour les PCR TTV !

D'un point de vue « vie personnelle », je voudrais remercier ma famille, en particulier mes parents à qui je dois tout. Merci de me soutenir dans tout ce que j'entreprends, et de me conseiller aussi sagement. Je pense aussi à mon petit frère, à qui je ne dis pas assez que je suis fière de lui. Quel bel homme tu es devenu, j'admire la personne que tu es, et je te souhaite sincèrement le meilleur, où que tu sois !

Je ne peux oublier dans ces remerciements 16 et Jérèm, mes amis de merde ! Je ne vous le dis pas assez, je vous aime ! Merci d'être là pour chaque épreuve de ma vie et ce depuis toujours, merci pour cette douzaine d'années de fous rires plus tordus les uns que les autres, ces conversations où on parlait pas de toi, pour ces repas gargantuesques mode *pillow licorne et paillettes dorées* avec le reste de la troupe, Emilie, Fanny, et tous les autres ! Jérèm, mention spéciale pour ton hospitalité ..!

Pour finir, je voudrais adresser quelques mots au Bruce Wayne qui partage ma vie ; quel héros tu fais de me supporter ! Merci infiniment pour ta patience ces derniers mois, ton soutien quotidien, tu sais toujours me faire sourire, et ce, malgré la distance. Tu n'as pas idée que sans toi rien n'aurait été aussi facile !



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Remerciements	4
Droits d’auteurs.....	6
Table des matières	7
Abréviations	10
Avant-propos.....	13
Introduction.....	15
Chapitre I. Les Myeloid-Derived Suppressor Cells	16
I.1. Introduction	16
I.2. Découverte	16
I.3. Myélopoïèse	18
I.4. Origine des MDSC	19
I.5. Phénotype.....	22
I.5.1. Phénotype chez la souris	22
I.5.2. Phénotype chez l’homme	23
I.6. Activités immunosuppressives	24
I.6.1. Induction de cellules immuno-régulatrices	24
I.6.2. Déplétion des nutriments	25
I.6.3. Génération d’un stress oxydatif.....	26
I.6.4. Actions sur la mobilité et la prolifération des L _T	26
I.6.5. L’axe PD-1 / PD-L1.....	27
I.6.6. Conclusions sur les activités immunosuppressives	29
I.7. Accumulation et activation des MDSC	30
I.8. Plasticité des MDSC	32
I.9. MDSC et pathologies	32
I.9.1. MDSC et environnement tumoral.....	33
I.9.2. MDSC et maladies inflammatoires	35
I.9.3. MDSC, transplantations de CSH et GvHD	38
I.9.4. MDSC et infections bactériennes.....	39
I.9.5. MDSC et infections virales	40
I.10. MDSC et approches thérapeutiques	41
Chapitre II. Le sepsis.....	43
II.1. Introduction	43
II.2. Définitions.....	43
II.2.1. Anciennes définitions.....	43



II.2.2. Place du score SOFA dans la nouvelle définition du sepsis	45
II.3. Epidémiologie	47
II.4. Facteurs associés au sepsis.....	48
II.5. Biomarqueurs	49
II.6. Physiopathologie	50
II.6.1. Inflammation.....	50
II.6.2. Immunosuppression	52
II.7. Modèles murins.....	55
II.7.1. Modèle non chirurgical	56
II.7.2. Modèle chirurgical	56
II.8. Physiopathologie cellulaire.....	58
II.8.1. Les neutrophiles.....	58
II.8.2. Les monocytes et macrophages	59
II.8.3. Les lymphocytes.....	60
II.8.4. Autres cellules immunitaires	61
II.8.5. Les cellules non immunitaires.....	62
II.9. Parallèle entre sepsis et cancer	63
II.10. Thérapies	66
II.10.1. Traitement classique.....	66
II.10.2. Thérapies immuno-modulatrices.....	67
II.10.3. Thérapies par les phages	70
Chapitre III. Le Torque Teno Virus.....	72
III.1. Introduction	72
III.2. Structure et génome.....	72
III.3. Prévalence et Transmission	75
III.4. Tropisme cellulaire	76
III.5. Implication dans les pathologies humaines	77
III.5.1. Pathologies hépatiques.....	77
III.5.2. Pathologies respiratoires	78
III.5.3. Cancers.....	79
III.5.4. TTV et état d'immunodépression	79
III.6. Immunologie et TTV	80
Objectifs	82
Résultats.....	84
Chapitre I. Article.....	85
I.1. Introduction	85
I.2. Manuscrit.....	87
Chapitre II. Evaluation de l'immunodépression chez les patients septiques	126
II.1. Introduction	126
II.2. Matériel et méthode	127

II.2.1. Extraction de l'ADN viral	127
II.2.2. PCR en temps réel (qPCR) et analyses des résultats.....	128
II.2.3. Analyses statistiques.....	128
II.3. Résultats	129
II.3.1. Etude de la réactivation virale au cours du sepsis.....	129
II.3.2. Corrélations entre la charge virale du TTV et le statut immunitaire	132
II.4. Discussion et perspectives.....	134
Chapitre III. Evaluation de l'impact du G-CSF sur les populations myéloïdes, chez des donneurs de cellules souches hématopoïétiques.....	137
III.1. Introduction.....	137
III.2. Matériel et méthodes.....	138
III.2.1. Patients, échantillons et données cliniques	138
III.2.2. Cytométrie en flux	139
III.3. Résultats	141
III.3.1. Effet du G-CSF sur les populations myéloïdes dans le sang périphérique	141
III.3.2. Comparaison de deux types de greffons : les moelles osseuses et les produits d'aphérèse	144
III.3.3. Comparaison des différents échantillons	146
III.3.4. Expression de PD-L1 dans les divers échantillons.....	148
III.4. Discussion et perspectives.....	149
Discussions, perspectives et conclusions	152
1. Origine médullaire	152
2. MDSC dans le sepsis	154
3. Effet du G-CSF.....	157
4. Conclusions.....	160
Références bibliographiques.....	162
Table des illustrations	186
Table des tableaux.....	188



Abréviations

A

ADAM: *A Disintegrin And Metalloproteinase-17*

ADN: Acide DésoxyribloNucléique

ALAT: ALanine Amino Transférerase

APC: *AlloPhycoCyanin*

ARG1: Arginase 1

ARN: Acide RiboNucléique

B

Bcl2: *B-Cell Lymphoma 2*

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

BV : *Brillant Violet*

C

CARS: *Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome*

CCL: *Chemokine (C-C motif) Ligand*

CD: Cluster de Différenciation

CLR: *C-type lectin Like Receptor*

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMP: *Common Myeloid Progenitor*

CMV: *Cytomegalovirus*

COX: Cyclo-Oxygénase

CPA: Cellules Présentatrices d'Antigène

CRP: Protéine C-Réactive

CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques

CXCL: *Chemokine (C-X-C motif) Ligand*

D

DAMP: *Damage Associated Molecular Pattern*

DC : Cellule Dendritique

DLBCL : *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*

E

EBV: *Epstein - Barr Virus*

F

FcγRI: Récepteur Fc-gamma 1

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

FITC: *Fluorescein IsoThioCyanate*

G

G-CSF: *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

G-CSF-R: *Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor*

G-MDSC: *Granulocytic-MDSC*

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GMP: *Granulocyte Myeloid Progenitor*

Gr-1: *Granulocyte Receptor-1*

GvL: *Graft versus Leukemia*

GvHD: *Graft versus Host Disease*

H

HIF-1α: *Hypoxia-inducible factor 1α*

HLA-DR: *Human Leukocyte Antigen D Related*

H₂O₂: Péroxyde d'hydrogène

HSV: *Herpes Simplex Virus*

I

ICAM: *InterCellular Adhesion Molecul*

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IDO: *Indoleamine 2, 3-dioxygenase*



IFNAR1: *Interferon alpha and beta-receptor subunit 1*

IFNGR1: *Interferon gamma receptor 1*

Ig: Immunoglobuline

IFN: Interféron

IL: Interleukine

IMC : Cellules Myéloïdes Immatures

iNOS: *inductible NO-Synthase*

IRF: *Interferon Regulatory Factor*

J

JAK: Janus Kinase

L

Lin: *Lineage*

L_B: Lymphocyte B

L_T: Lymphocyte T

LXR : *Liver X Receptor*

M

MAP: Pression Artérielle Moyenne

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

M-CSF: *Macrophage Colony Stimulating Factor*

MDSC: *Myeloid-Derived Suppressor Cells*

miARN : micro ARN

MICI: Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

M-MDSC: *Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell*

MMP: Métalloprotéinase

N

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NC: *Null Cell*

NF-κB: *Nuclear Factor-κB*

NS: *Natural Suppressor*

NK: *Natural Killer*

NMI: *N-myc interactor*

NLR: *Nucleotide-binding oligomerization domain Like Receptor*

NO: Nitric Oxide

NOS: *Nitric Oxyde Synthase*

O

ONOO⁻: Péroxydinitrite

ORF: *Open Reading Frame*

P

PAMP: *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PCT: Procalcitonine

PD-1/PD-L1: *Programme Death / Ligand*

PE: *PhycoErythrine*

PerCP : *Peridinin Chlorophyll Protein complex*

PGE: ProstaGlandine E

PI3K: *Phosphoinositide 3-Kinase*

PICS: *Persistent*

Inflammatory/Immunosuppression Syndrom

PIRO: *Predisposition, Infection, Response, Organ Dysfunction*

PMN-MDSC: *Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell*

PRR: *Pattern Recognition Receptor*

Q

qSOFA: *quick Sequential Organ Failure Assessment*

R

RAGE: *Receptor for Advanced Glycation End products*

RANKL: *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*

RLR: *Retinoic acid-inductible gene Like Receptors*

ROS: *Reactive Oxygen Species*



S

SIDA: Syndrome de l'Immuno Déficience Acquis
SIRS: Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique
SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*
STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*
SSC: *Surviving Sepsis Campaign*

T

TAM: *Tumor Associated Macrophages*
TAN: *Tumor Associated Neutrophils*
TCR: *T-Cell Receptor*
TGF: *Transforming Growth Factor*
TLR: *Toll-Like Receptor*
TIM: *T-cell Immunoglobulin Mucin*
TNF: *Tumor Necrosis Factor*

TNM: *Tumor, Nodes, Metastasis*
Treg: T régulateurs
TTMDV: Torque Teno MiDi Virus
TTMV: Torque Teno Mini Virus
TTV: Torque Teno Virus
TSS: Syndrome du Choc Toxique

U

UTR: *UnTranslated Region*

V

VEGF: *Vascular Endothelium Growth Factor*
VHB : Virus de l'Hépatite B
VHC: Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine



Avant-propos

Mon travail de thèse a consisté en l'étude des deux sous-populations de cellules d'origine myéloïde à caractère suppressif (MDSC) dans un contexte d'infection, qu'est le sepsis. Nous avons voulu, au travers de cette étude, éclaircir certaines connaissances concernant ces cellules et définir leurs rôles dans l'état d'immunodépression observé au cours du sepsis.

Mon document comprendra quatre grandes parties.

La première partie est une introduction bibliographique. Tout d'abord, nous décrirons dans un premier chapitre les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), en abordant différents aspects, notamment leurs caractérisations, leurs activités et leurs implications dans certaines pathologies. Dans un second chapitre, nous décrirons la pathologie dans laquelle nous avons étudié ces cellules. Nous nous intéresserons donc au sepsis et nous focaliserons sur les réponses immunes et bouleversements immunitaires survenant au cours de ce syndrome. Enfin, dans un troisième chapitre, nous aborderons quelques généralités sur le Torque Teno Virus, qui nous a intéressé dans le cadre de la réactivation virale au cours de l'immunosuppression du sepsis.

La seconde partie définira les objectifs de la thèse. Elle restituera la problématique de l'étude au regard des travaux antérieurs du laboratoire et des données bibliographiques qui ont conduit à notre hypothèse de travail.

La troisième partie présentera les différents résultats expérimentaux obtenus. Le premier chapitre consistera en l'étude de l'origine et du rôle des MDSC dans le sepsis, et qui fait l'objet d'un article scientifique actuellement en cours de soumission. Le second chapitre présentera des résultats préliminaires sur la réactivation virale au cours du sepsis, et d'une manière plus générale, les résultats cliniques témoignant de l'état d'immunodépression faisant suite à un sepsis. Nous aborderons dans ce second chapitre, une étude à laquelle nous avons apporté notre aide, via la cohorte de patients que nous avons construite. Dans



un troisième chapitre, nous présenterons l'effet d'une cytokine (le G-CSF) sur les populations myéloïdes, chez des donneurs de cellules souches hématopoïétiques.

Nous achèverons ce manuscrit dans une quatrième partie, avec une discussion générale permettant d'aborder le sujet d'une manière plus globale, ainsi que par une conclusion et des perspectives résultantes de ces travaux.



Introduction



Chapitre I. Les Myeloid-Derived Suppressor Cells

I.1. Introduction

Les cellules d'origine myéloïde à caractère suppressif ou *Myeloid-Derived Suppressor Cells* (MDSC) font l'objet d'un grand intérêt ces dernières années. En effet, de nombreuses études s'intéressent à ces cellules avec notamment plus de 500 articles publiés seulement en 2017 (Septembre 2018 : www.pubmed.gov). Elles sont un groupe hétérogène de cellules myéloïdes immatures ayant une fonction suppressive sur les cellules de l'immunité, principalement les lymphocytes T.

Les MDSC peuvent être retrouvées à de très faibles quantités dans le sang d'individus sains, mais leur nombre augmente très significativement dans le cas de cancer, d'inflammation et d'infections (Ost *et al.*, 2016).

Le rôle physiologique des MDSC et leur régulation sont toujours mal compris. Cependant, comme pour les lymphocytes T régulateurs, les MDSC semblent avoir un rôle protecteur en régulant les réponses immunitaires et préviennent donc des dommages collatéraux liés aux infections.

I.2. Découverte

Dans les années 1960s, des cellules appelées « *Natural Suppressor cells* » ou NS cells, ont été décrites dans des modèles murins de tumeurs solides et sont associées à la croissance tumorale (Lappat and Cawein, 1964). Ces cellules s'infiltreraient à la fois dans la tumeur, mais aussi dans les organes lymphoïdes et le parenchyme d'autres organes. La présence de cette population cellulaire est également associée à une lymphopénie et à la perte de la fonction des lymphocytes T (L_T) (Lee and Rosse, 1982). Il a donc été suggéré un rôle potentiel sur l'échappement de la tumeur au système immunitaire et sur la prolifération des cellules cancéreuses. Les premières idées de cibles thérapeutiques visant à cibler les NS cells ont émergé (Talmadge and Gabrilovich, 2013).

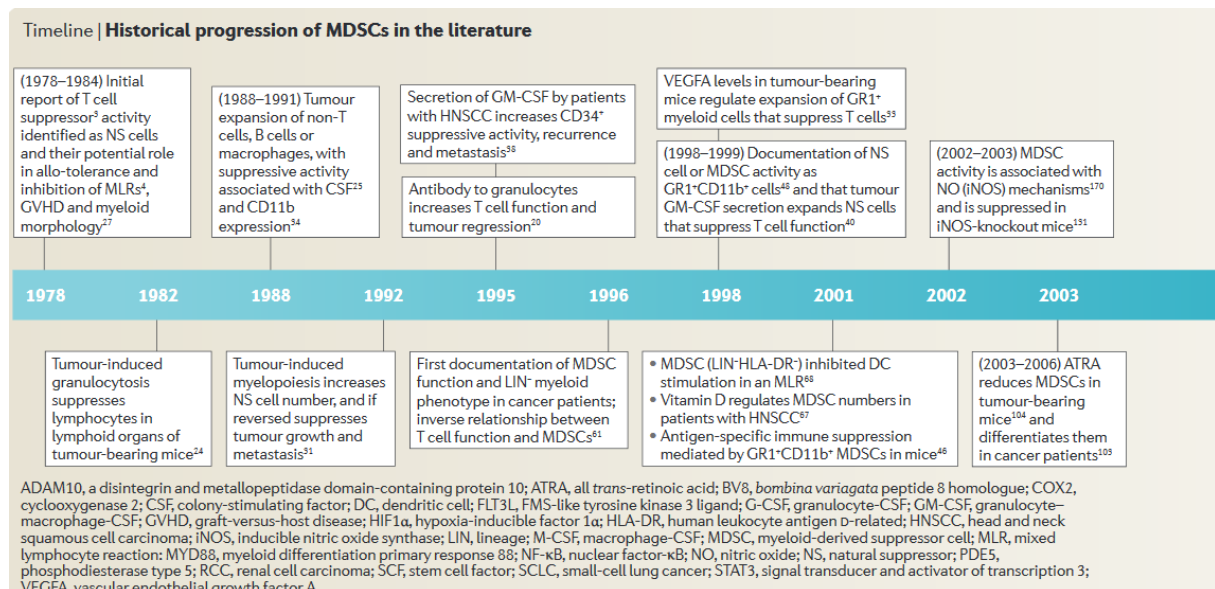


Au cours des années 1970s et 1980s, plusieurs travaux démontrent les propriétés inhibitrices des NS cells sur les L_T dans le cancer, montrant ainsi leurs capacités à favoriser l'échappement de la tumeur au système immunitaire (Buessow *et al.*, 1984; Talmadge *et al.*, 1984; Young *et al.*, 1992). Cependant, aucun marqueur conventionnel des cellules T, B, et des macrophages, ne sont exprimés par les NS cells (Oseroff *et al.*, 1984). On les appela alors, les NC pour « *Null Cells* ».

Ce n'est que fin des années 1990s qu'un premier phénotype est suggéré comme étant celui des cellules myéloïdes suppressives, trouvées dans les rates de souris portant des tumeurs (Bronte *et al.*, 1999). Leurs phénotypes sont similaires aux monocytes et aux neutrophiles, mais leurs fonctions sont bien distinctes.

En 2007, dans une lettre puis un consensus, et dans le but d'unifier les différentes descriptions de ces cellules, le nom de *Myeloid-Derived Suppressor Cells* (MDSC) est proposé (Gabrilovich *et al.*, 2007). Ce nom est établi selon leur origine myéloïde, et sur leur caractéristique fonctionnelle principale, leur activité immunosuppressive.

L'historique de la découverte et des études principales de la caractérisation des MDSC est schématisé dans la **Figure 1**.



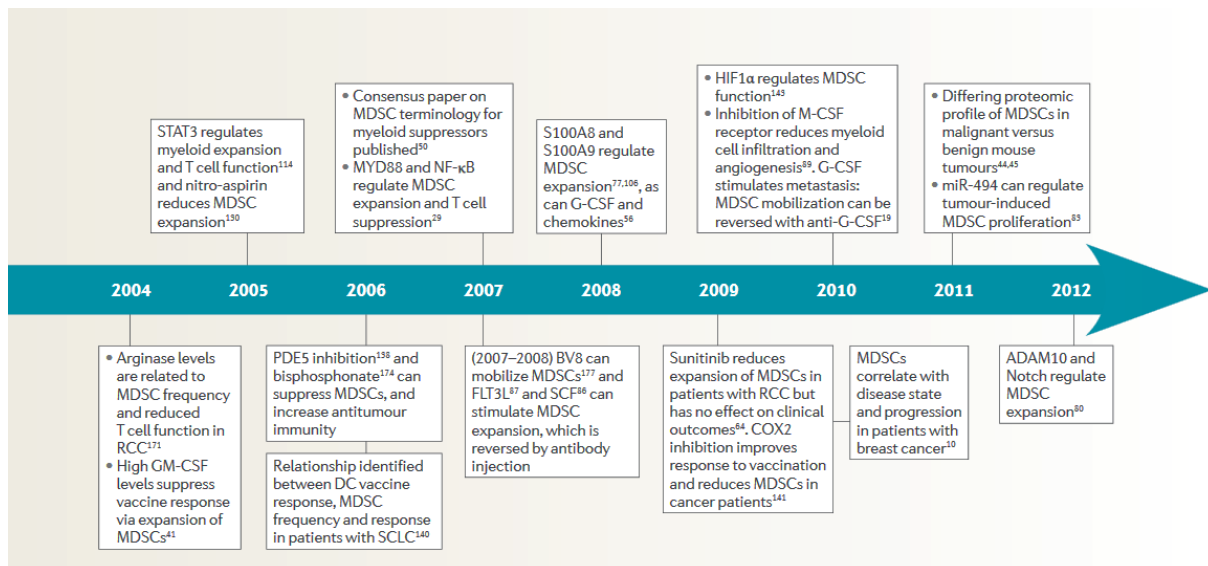


Figure 1 : Histoire de la découverte et de l'étude des MDSC (Talmadge and Gabrilovich, 2013).

I.3. Myélopoïèse

L'hématopoïèse est un processus permettant à l'organisme de produire les éléments figurés du sang (hématies, leucocytes et plaquettes). Les cellules souches hématopoïétiques, capables de s'auto-renouveler, se différencient et assurent ainsi le renouvellement des cellules du sang. Au sein de l'hématopoïèse, nous distinguons la lymphopoïèse permettant la production des lymphocytes, et la myélopoïèse permettant la production des cellules myéloïdes (hématies, polynucléaires, monocytes et thrombocytes).

A l'état normal, la myélopoïèse est un processus très structuré, où les progéniteurs de précurseurs acquièrent des marqueurs spécifiques et la fonction de circulation des leucocytes, en perdant peu à peu la capacité très spécifique de s'auto-renouveler. Le renouvellement des leucocytes matures est primordial, et quelques milliards de cellules sont générées et remplacées quotidiennement.

Diverses conditions pathologiques peuvent perturber la production de leucocytes résultant en une myélopoïèse d'urgence, qui produit des cellules capables d'éliminer d'éventuelles menaces, des tissus endommagés, ou encore des cellules dont la croissance est anormale (tumeur) (Millrud *et al.*, 2016). Si ces conditions sont résolues rapidement, la balance des cellules myéloïdes est restaurée sans conséquences néfastes pour l'organisme.

En revanche, certaines conditions telles que les infections chroniques, les maladies auto-immunes, et les cancers, sont caractérisées par une myélopoïèse faible mais persistante dans le temps, résultant en l'accumulation de cellules immatures myéloïdes. Celles-ci sont d'un point de vue génomique, biochimique et fonctionnel différentes des leucocytes matures bien qu'elles présentent une morphologie et un phénotype similaire aux neutrophiles et monocytes (Gabrilovich, 2017).

Les protéines S100A8 et S100A9, aussi appelées Calgranuline A et B sont impliquées dans le chimiotactisme des MDSC et d'autres cellules myéloïdes. Normalement exprimées dans la moelle au cours de la myélopoïèse, elles peuvent être induites par les kératinocytes, les cellules épithéliales ou les ostéoclastes dans des conditions inflammatoires (Austermann *et al.*, 2017). Les protéines S100A8 et S100A9 interagissent avec leurs récepteurs RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*) présents à la surface des MDSC, ce qui va induire, en plus du chimiotactisme, l'augmentation de leur activité immunosuppressive via la voie NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) (Goh *et al.*, 2013).

I.4. Origine des MDSC

Le terme MDSC a été formulé dans le but de décrire une population de cellules suppressives non-lymphoïde avec une origine myéloïde (Gabrilovich *et al.*, 2007).

Plusieurs théories sur l'origine des MDSC ont été proposées, et sont schématisées dans la **Figure 2**.

- La myélopoïèse d'urgence et myélopoïèse extra-médullaire. La myélopoïèse d'urgence est un mécanisme permettant la production de cellules myéloïdes qui sortent de la moelle osseuse, avant d'être complètement matures. Ce processus se manifeste en réponse à un signal inflammatoire, dans le but de restaurer ou de remplacer les populations périphériques endommagées (Panopoulos and Watowich, 2008). Il s'agirait donc de cellules myéloïdes immatures (IMC) qui migrent dans le sang où elles deviennent des MDSC fonctionnellement actives c'est-à-dire avec des propriétés suppressives (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Cela correspond alors à une myélopoïèse extra-médullaire, définie comme étant une myélopoïèse se produisant dans des organes en dehors de la moelle osseuse, tels



que la rate (Kim, 2010). Ce phénomène est fréquemment vu dans le cas d'inflammations chroniques, de cancers, de trauma et sepsis.

- Le blocage de la différenciation. Dans certaines conditions pathologiques, la myélopoïèse d'urgence crée une expansion prolongée d'IMC qui migrent en périphérie. Ces IMC seraient stoppées dans leur maturation à cause de médiateurs inflammatoires tels que le S100A8, S100A9, le *Vascular Endothelium Growth Fator* (VEGF), l'Interleukine-10 (IL-10), et la Prostaglandine E₂ (PGE₂) (Allavena *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2008; Gabrilovich *et al.*, 1998; Obermajer *et al.*, 2011). En effet, lorsque des MDSC sont extraites du microenvironnement tumoral, le blocage de la différenciation n'a plus lieu et les MDSC peuvent se différencier en cellules myéloïdes matures, préférablement en monocytes/macrophages ou cellules dendritiques (Kusmartsev *et al.*, 2003).

- Reprogrammation des monocytes en MDSC monocytiques (M-MDSC). Dans des conditions normales, les monocytes se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques (DC). Il est possible que les M-MDSC aient pour origine les monocytes qui acquièrent un phénotype suppressif lors de certaines conditions inflammatoires (Pena *et al.*, 2011; Porta *et al.*, 2009). Ces monocytes anti-inflammatoires reprogrammés se différencieraient en M-MDSC dans le but de limiter les effets dévastateurs de la réponse inflammatoire lors d'un sepsis par exemple. Les mécanismes moléculaires de ce processus mettraient alors en jeu une stimulation répétée des *Toll-Like Receptors* (TLR), associée à la présence de cytokines et de médiateurs inflammatoires (IL-10, PGE₂) (Németh *et al.*, 2009). Ceci conduit à la formation d'homodimère immunosuppresseur p50:p50 de NF-κB à la place de l'hétérodimère pro-inflammatoire p65:p50 (Bergenfelz *et al.*, 2012).

- Activation des neutrophiles en MDSC polymorphonucléaires (PMN-MDSC). Les neutrophiles ont été décrits à la fois avec des fonctions anti-tumorigène et pro-tumorigène (neutrophile N1 et N2 respectivement). Ces différentes fonctions dépendraient du microenvironnement, de l'intensité de l'inflammation, des cellules avec lesquelles ils interagissent, et de leur état d'activation (Brandau *et al.*, 2013). Ceci illustre la plasticité et l'hétérogénéité des neutrophiles, qui pourrait expliquer la théorie « *immunosuppressive switch* » des neutrophiles, selon laquelle les PMN-MDSC seraient des granulocytes activés (Granot and Fridlender, 2015). Selon cette théorie, qui a été émise dans le cadre du cancer, les cellules de l'immunité voient leur phénotype modifié et acquièrent un phénotype créant



un environnement suppresseur, et supportant la croissance tumorale. Ainsi, les neutrophiles présents dans le microenvironnement tumoral ne sont plus là comme ligne de défense face aux pathogènes, mais ont acquis la capacité d'induire l'angiogenèse et la croissance tumorale par la production de chimiokines. Ces neutrophiles ont été nommés *Tumor-Associated Neutrophil* (TAN), du fait de leurs rôles.

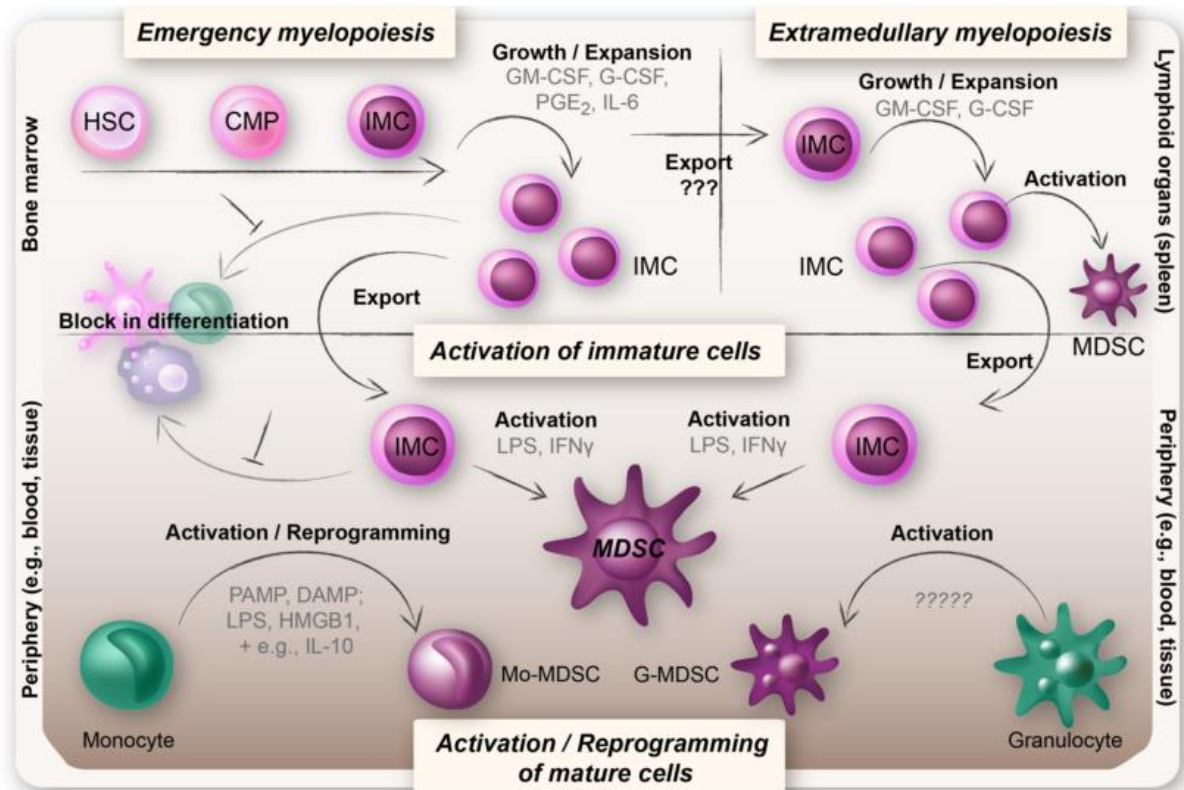


Figure 2 : Vue d'ensemble des théories sur l'origine des MDSC (Millrud et al., 2016).
 En haut à gauche : Les IMC se multiplient dans la moelle osseuse et migrent vers la périphérie c'est la myélopoïèse d'urgence. Les IMC peuvent être bloquées dans leur différenciation pour devenir des MDSC fonctionnellement actives lorsqu'elles sont exposées à des médiateurs de l'inflammation. En haut à droite : Les IMC peuvent aussi se développer et devenir des MDSC fonctionnellement actives en dehors de la moelle osseuse. En bas : Les M-MDSC et les PMN-MDSC sont des monocytes et granulocytes activés ou reprogrammés. La reprogrammation des monocytes en M-MDSC est liée à l'activation répétée des TLR associée à la présence de cytokines et médiateurs inflammatoires. Les PMN-MDSC seraient un état d'activation des neutrophiles.

I.5. Phénotype

I.5.1. Phénotype chez la souris

Les MDSC ont d'abord été décrites dans des modèles murins de tumeurs solides, aussi le phénotype de ces cellules a dans un premier temps été exploré chez les souris (Lappat and Cawein, 1964). La caractérisation phénotypique des « *Natural Suppressor Cells* » chez la souris fut tout d'abord très controversée, du fait qu'aucun marqueur phénotypique n'était connu, et puisqu'elles ont dans un premier temps été définies selon leurs fonctions suppressives. Par la suite, plusieurs marqueurs ont été identifiés tels que le CD34, le Gr-1 (*Granulocyte Receptor-1*) ou le CD11b (Talmadge and Gabrilovich, 2013). Le CD34 est une molécule d'adhésion présente à la surface des progéniteurs hématopoïétiques, leur permettant la fixation à la matrice extra-cellulaire et aux cellules stromales (Nielsen and McNagny, 2008). Le marqueur myéloïde Gr-1 est exprimé par les granulocytes et macrophages ; dans la moelle son expression est directement liée à maturation des granulocytes (Hestdal *et al.*, 1991). Enfin, le CD11b est un membre de la famille des intégrines exprimés par les cellules myéloïdes, et permet les interactions cellulaires grâce à ses ligands (*InterCellular Adhesion Molecule* : ICAM).

Le phénotype utilisé aujourd'hui pour caractériser les MDSC murines a été suggéré à la fin des années 1990 par Bronte et son équipe (Bronte *et al.*, 1998). Les MDSC murines sont définies à l'aide de deux marqueurs de surface à savoir le Gr-1 et le CD11b. Le marqueur Gr-1 est exprimé par deux molécules de surface, les Ly6C et Ly6G. L'expression de ces deux derniers marqueurs permet de diviser les MDSC en deux sous-populations (Bronte *et al.*, 2016) (**Tableau 1**):

- les MDSC monocytiques (M-MDSC) définies comme étant CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺, et possédant une morphologie apparentée aux monocytes,
- les MDSC granulocytiques (PMN-MDSC) définies comme CD11b⁺ Ly6G⁺ et Ly6C⁻ et ayant une morphologie proche des granulocytes.

D'autres marqueurs peuvent être utilisés en complément pour identifier les MDSC murines, tels que le F4/80 (ou Ly71), le CD31 (molécule d'adhésion *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) ou encore le CD115 (récepteur au *Macrophage Colony Stimulating Factor* ou M-CSF) (Zhao *et al.*, 2015).



1.5.2. Phénotype chez l'homme

Chez l'homme, les MDSC ont été identifiées dans la fraction des cellules mononucléées (PBMC). En termes de morphologie, de marqueurs de surface et de fonctions, les MDSC sont une population hétérogène de cellules myéloïdes. Elles présentent un mélange de marqueurs de surface typique des cellules myéloïdes, et n'expriment pas les marqueurs classiques des lymphocytes, des cellules *Natural Killer* (NK), des macrophages et des DC.

Chez l'homme, les MDSC comportent deux grands groupes de cellules nommés granulocytiques ou polymorphonucléaires (G-MDSC ou PMN-MDSC), qui sont phénotypiquement et morphologiquement similaires aux granulocytes c'est-à-dire avec un noyau polylobé, et les monocytiques (M-MDSC), phénotypiquement et morphologiquement similaires aux monocytes, avec un gros noyau rond (Bronte *et al.*, 2016).

Contrairement aux MDSC murines, le phénotype global n'a pas encore été clairement identifié. En effet, les marqueurs Gr-1 et CD11b sont caractéristiques des MDSC murines. De tels marqueurs sont, jusqu'à aujourd'hui, inconnus chez l'homme. Les MDSC étaient d'ailleurs autrefois appelées « *Null Cells* », puisqu'aucun marqueur conventionnel des L_T , L_B et macrophages ne leur a été associé. Cependant, un phénotype minimum pour chaque sous-type a été admis et recommandé dans un souci d'homogénéisation des résultats (Bronte *et al.*, 2016) (

Tableau 1). Les PMN-MDSC sont définis comme $CD11b^+ CD14^- CD15^+$ ou $CD66^+$ et les M-MDSC sont définis comme $CD11b^+ CD14^+ CD15^- HLA-DR^{/low}$ (*Human Leukocyte Antigen D Related*). Le marqueur myéloïde CD33 peut être utilisé à la place du CD11b. Ainsi, les M-MDSC expriment fortement le marqueur CD33 alors que les PMN-MDSC affichent une expression plus faible du CD33 ($CD33^{dim}$). Les cellules Lin^- (incluant le CD3, CD14, CD15, CD19 et CD56) $HLA-DR^- CD33^+$ contiennent un groupe de progéniteurs immatures. Ces cellules ont été définies comme immatures MDSC ou early-stage MDSC (eMDSC) et l'équivalent murin n'a, à ce jour, pas été clairement identifié (Bronte *et al.*, 2016; Youn *et al.*, 2008). D'autres marqueurs continuent d'être trouvés permettant d'affiner l'identification des MDSC chez l'homme, tels que le CD115 (récepteur au M-CSF), le CD124 (récepteur de l'IL-4), le CD40, et le CD80 (Poschke *et al.*, 2010).

Il est important de rappeler que l'analyse phénotypique n'est qu'un point de départ dans le processus d'identification des MDSC chez l'homme. En effet, les activités

immunosuppressives sont une caractéristique importante à vérifier, puisqu'aucun marqueur spécifique pour ces cellules n'a été à ce jour identifié.

Tableau 1 : Phénotypes minimums nécessaires à l'identification des MDSC chez l'homme et chez la souris (Bronte *et al.*, 2016):

Populations de MDSC	Phénotype chez la souris	Phénotype chez l'homme (dans les PBMC)
MDSC totales	CD11b ⁺ Gr-1 ⁺	Pas clairement déterminé
PMN-MDSC	CD11b ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ⁻	CD33 ^{dim} CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺
M-MDSC	CD11b ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ⁻	CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD15 ⁻ HLA-DR ^{-/low}
e-MDSC	Pas clairement déterminé	Lin ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺

1.6. Activités immunosuppressives

Le phénotype n'étant pas suffisant pour l'identification précise des MDSC, des tests fonctionnels doivent être réalisés afin de confirmer le phénotype analysé (Bronte *et al.*, 2016). Pour cela, il faut comprendre en détail les activités immunosuppressives de ces cellules. Les mécanismes d'immunosuppression utilisés par les MDSC peuvent être classifiés en plusieurs groupes.

1.6.1. Induction de cellules immuno-régulatrices

Le premier groupe de mécanismes concerne la capacité des MDSC à induire une réponse immune immunosuppressive. De nombreuses études ont montré une corrélation entre MDSC et lymphocytes T régulateurs (Treg) dans divers types de cancers : reins, pancréas et cancers gastriques (Gabitass *et al.*, 2011; Ko *et al.*, 2009). Les MDSC sont impliquées dans la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ en Treg, soit par contact cellule-cellule avec l'interaction des CD40/CD40L, soit indirectement par la production de cytokines, notamment l'IL-10 et l'interféron- γ (IFN- γ) (Pan *et al.*, 2010; Safarzadeh *et al.*, 2017). Les

Treg inhibent ensuite l'action des lymphocytes via des facteurs solubles (cytokines telles que l'IL-10, le *Transforming Growth Factor-β* ou TGF-β, l'IL-35) ou en induisant directement l'apoptose (Hoechst *et al.*, 2008).

Enfin les MDSC seraient également capables via la production de TGF-β et d'acide rétinoïque, d'induire la transdifférenciation des cellules T_H17 en Treg (Hoechst *et al.*, 2011).

1.6.2. Déplétion des nutriments

Les MDSC sont également capables de priver les L_T des acides aminés présents dans le milieu et essentiels pour leur croissance et leur différenciation. Le mécanisme le plus important est la déplétion de la L-arginine.

Grâce à l'arginase 1 (ARG1), les MDSC métabolisent la L-arginine du microenvironnement en urée et L-ornithine. Chez l'homme, les neutrophiles sont la principale source d'ARG1, dans le sang (Jacobsen *et al.*, 2007). La L-arginine est un élément essentiel au maintien de la durée de la demi-vie de l'ARNm du CD247 (CD3ζ), une des sous-unités intracellulaires du *T-Cell Receptor* (TCR) (Rodriguez *et al.*, 2002). L'expression du CD247 étant diminuée, la fonctionnalité des L_T est alors atteinte. La voie de la Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) sera aussi atténuée suite à la diminution de la quantité de L-arginine, ce qui bloquera directement la prolifération des L_T en phase G0 – G1 (Rodriguez *et al.*, 2007).

Un second mécanisme résultant en l'inhibition des L_T par la déplétion en L-arginine a été décrit. Feldmeyer *et al.*, ont montré que la déphosphorylation de la cofiline est diminuée par la déplétion en L-arginine. La cofiline est une protéine nécessaire au remodelage de la F-actine, essentielle à la formation de la synapse immunologique et à la prolifération des L_T (Feldmeyer *et al.*, 2012).

Les MDSC sont également capables de séquestrer la L-cystéine, puisqu'elles n'expriment pas le transporteur permettant d'en relarguer, ce qui va renforcer la privation du milieu en acides aminés (Srivastava *et al.*, 2010).

Les MDSC expriment aussi l'*indoleamine 2,3 dioxygenase* (IDO) provoquant la catabolisme du tryptophane en kynurénine ; ce métabolite intervient entre autre dans la différenciation des CD4⁺ en Treg (Mezrich *et al.*, 2010). La diminution de la quantité en

tryptophane dans le microenvironnement et la production de métabolites cytotoxiques a pour effet de limiter la prolifération et la survie des L_T (Bruger *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2013).

1.6.3. Génération d'un stress oxydatif

Le troisième groupe de mécanismes concerne la production d'espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène (ROS et NO). Les NO sont générés par le complexe de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) oxydase et agissent comme messenger intra-cellulaire. Cependant, la formation d'anion super-oxyde (O_2^-) peut réagir avec l'oxyde nitrique (NO), produisant alors des espèces réactives du nitrogène, telles que le peroxy-nitrite ($ONOO^-$). Celui-ci est généré grâce à la *Nitric Oxyde Synthase 2* (NOS2 ou *inductible NO-synthase*, iNOS), avec laquelle les MDSC catalysent la L-arginine en citrulline et NO (Ost *et al.*, 2016). La sécrétion d'espèces réactives du nitrogène telles que le NO, est responsable de la nitrosylation des protéines. La nitrosylation du TCR a pour conséquences sa régulation négative et son internalisation (Bruger *et al.*, 2018).

Par ailleurs, les MDSC peuvent libérer des molécules oxydantes telles que les ROS, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à partir de O_2^- . L' H_2O_2 induit une modification de la chaîne ζ du TCR (CD247), inhibant ainsi la transduction de signaux d'activation des L_T via le TCR (Pillay *et al.*, 2013; Safarzadeh *et al.*, 2017). Cet agent oxydant est également impliqué dans l'induction de l'apoptose des L_T mais aussi de l'oxydation de la cofiline, ce qui résulte en la perte de la phosphorylation en Serine 3. La cofiline déphosphorylée est alors incapable d'induire la dépolymérisation de l'actine, perturbant sévèrement son remodelage au sein du lymphocyte et par la suite, la formation de la synapse immunologique (Klemke *et al.*, 2008).

Enfin, le stress oxydatif bloque l'activation de la voie NF- κ B conduisant à une baisse de l'activation des L_T (Malmberg *et al.*, 2001).

1.6.4. Actions sur la mobilité et la prolifération des L_T

Les MDSC sont également capables d'interférer avec la migration et la viabilité des L_T . En effet, la métallo-protéinase ADAM17 (*A Disintegrin And Metalloproteinase-17*) exprimée par les MDSC clive le ligand du CD62 (CD62L ou L-selectin) à la surface des cellules T, nécessaire à leur migration dans les ganglions lymphatiques (Hanson *et al.*, 2009).

Elles peuvent aussi induire l'apoptose des L_T en diminuant l'expression de Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*) ou en exprimant la galectine 9. Une fois la galectine 9 liée à TIM3 (*T-cell Immunoglobulin Mucin 3*), la voie Akt/mTOR/NF-κB est sollicitée et la viabilité des L_T altérée (Ferris *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2017).

Les MDSC peuvent modifier la conformation de la cytokine chimioattractrice CCL2, grâce au peroxy-nitrite (ONOO⁻) qu'elles produisent (Molon *et al.*, 2011). Cette cytokine ne peut donc plus se fixer à son récepteur CCR2 présent à la surface des L_T CD8⁺ qui ne sont donc plus recrutés.

Enfin des études ont montré que les MDSC sont capables d'inhiber les cellules NK par contact cellulaire :

- en interagissant avec le récepteur Nkp30 à la surface des NK (Hoechst *et al.*, 2009),
- en bloquant la production d'IFN-γ et l'expression du récepteur activateur NKG2D grâce à leur TGF-β membranaire (Li *et al.*, 2009).

1.6.5. L'axe PD-1 / PD-L1

Le *Program Death-Ligand 1* (PD-L1), aussi nommé CD274 ou B7-H1, est le ligand du récepteur de co-inhibition *Program Death 1* (PD-1), exprimé par les L_T. La liaison de PD-L1 à PD-1 active la phosphatase PTPN11 (*Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11*), qui déphosphoryle les médiateurs d'activation des L_T associés au TCR et au récepteur de co-stimulation CD28. Cette action conduit à l'inhibition de l'activation des cellules T afin de contrôler l'auto-immunité dans des conditions physiologiques (Hui *et al.*, 2017).

Le marqueur PD-L1 est souvent décrit dans le cadre de cancer, et est exprimé dans ces pathologies, par les cellules tumorales, conduisant donc à la suppression de l'immunosurveillance et à la progression de la tumeur. L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est associée à de mauvais résultats cliniques, dans différents types de cancers : le cancer gastrique, le cancer rénal, le cancer du pancréas, de l'ovaire, de la vessie (Wang *et al.*, 2016). Les cellules tumorales sont aussi capables d'induire l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC, participant à l'activité immunosuppressive des MDSC dans le microenvironnement (Prima *et al.*, 2017). Le taux d'expression de PD-L1 sur les MDSC est d'ailleurs corrélé à la progression tumorale dans différents types de cancers (Iwata *et al.*,

2016; Limagne *et al.*, 2016). De plus, Azzaoui et son équipe montrent à la fois une augmentation des populations de MDSC dans le sang de patients atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL : *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*), mais aussi une augmentation de l'expression de PD-L1 par ces cellules. Ils ont montré dans des expériences de co-culture *in vitro*, que le blocage de l'axe PD-1 / PD-L1 grâce à des anticorps monoclonaux, restaure la prolifération des L_T (Azzaoui *et al.*, 2016). Ces résultats ont été complétés par Ballbach et son équipe, qui ont bloqué PD-L1 à la surface de PMN-MDSC et obtenu, *in vitro*, le rétablissement de la prolifération des L_T (Ballbach *et al.*, 2017).

Une étude sur des souris déficientes pour le récepteur de l'IFN de type I (IFNAR1) a mis en évidence que l'expression de PD-L1 par les MDSC est activée par IFN de type I (IFN- α , IFN- β par exemple) produit par les MDSC elles-mêmes (Xiao *et al.*, 2018). Elles sont donc capables de maintenir leur expression de PD-L1 de manière autocrine, via la voie du *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* (STAT1), lorsque la production d'IFN- γ n'est plus suffisante, du fait de l'inhibition des L_T (**Figure 3**).

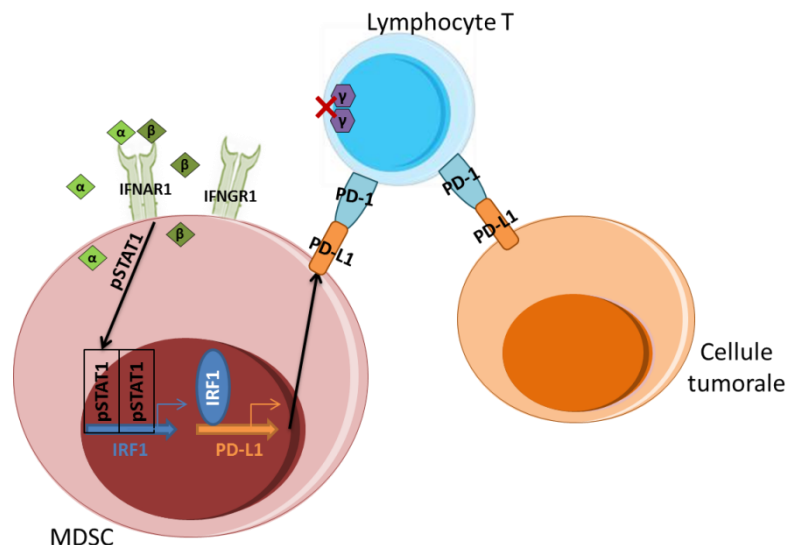


Figure 3 : Modèle de régulation de l'expression de PD-L1 par les MDSC dans le microenvironnement tumoral (modifié d'après Xiao *et al.*, 2018) : L'IFN- γ produit par les L_T activés est un régulateur majeur de PD-L1. Cependant dans le microenvironnement tumoral, l'activation des L_T peut être inhibée résultant en la perte ou la diminution de la production d'IFN- γ . En compensation, les MDSC peuvent sécréter des IFN de type I (IFN- α , IFN- β) afin de maintenir l'expression de PD-L1, et maintenir leur activité suppressive. (IFNAR1: Interferon

alpha and beta-receptor subunit 1; IFNGR1: Interferon gamma receptor 1; IRF1: Interferon Regulatory Factor 1).

1.6.6. Conclusions sur les activités immunosuppressives

Les différentes activités immunosuppressives utilisées par les MDSC pour inhiber les lymphocytes T sont résumées dans la **Figure 4**.

Les deux sous-types de MDSC diffèrent, en plus de leur phénotype, dans leurs mécanismes d'immunosuppression (Veglia *et al.*, 2018). Ainsi, les M-MDSC génèrent principalement des NO grâce aux NOS2, alors que les PMN-MDSC produisent de grandes quantités de ROS via l'action de la NADPH oxydase (Movahedi *et al.*, 2008; Youn *et al.*, 2008). Par ailleurs, les M-MDSC produisent de l'IL-10 et de la PGE₂, contrairement aux PMN-MDSC (Millrud *et al.*, 2016). Cependant, les M-MDSC et les PMN-MDSC expriment toutes deux des quantités similaires d'ARG1 (Youn *et al.*, 2008).

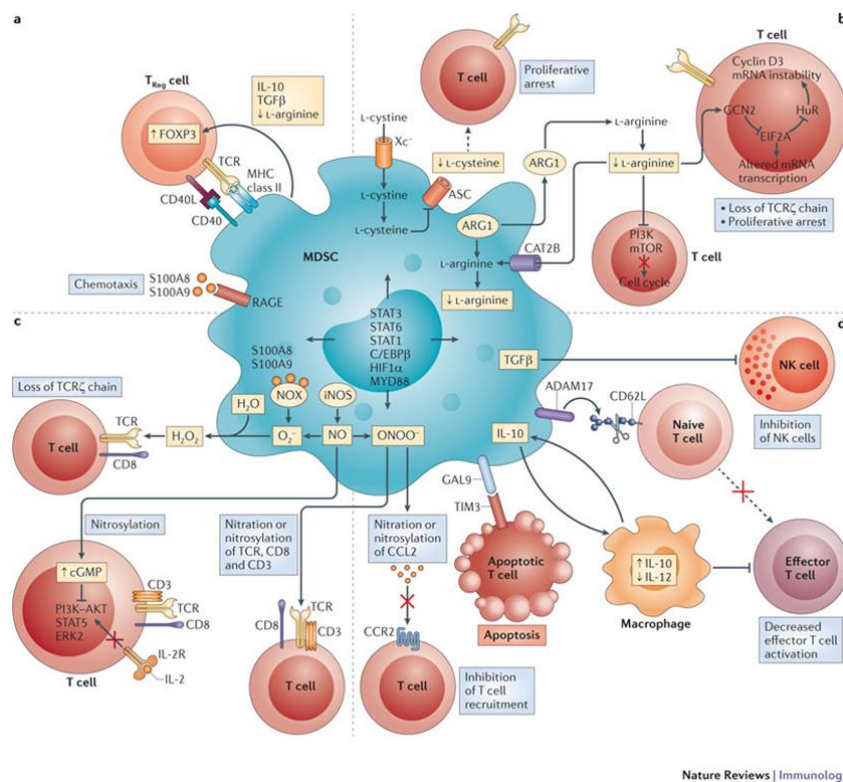


Figure 4 : Mécanismes d'inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T utilisés par les MDSC (Gabrilovich *et al.*, 2012).



I.7. Accumulation et activation des MDSC

L'accumulation de MDSC est un processus complexe. Condamine T *et al.* ont proposé un modèle décrivant ce phénomène, et selon lequel l'accumulation de MDSC requiert deux signaux (Condamine *et al.*, 2015) schématisés dans la **Figure 5**.

Le premier est responsable de l'expansion des cellules myéloïdes immatures et de l'inhibition de leur différenciation. Ce signal est principalement dirigé par des facteurs de croissance tumoraux tels que STAT3, IRF8, C/EBP β , activés par le GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), le G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), le VEGF ou l'IL-6 (Marigo *et al.*, 2010; Ost *et al.*, 2016). STAT3 joue un rôle crucial dans l'inhibition de l'apoptose des cellules myéloïdes et empêche la différenciation en cellules matures via l'expression des gènes *Bcl-xL* (*B-cell lymphoma-extra large*) et *c-myc* (Yin *et al.*, 2018). Il a été aussi montré chez des patients atteints de cancer rénal et traités au sunitinib (inhibiteur de récepteurs à activité tyrosine kinase), que le blocage de la voie de signalisation de STAT3 grâce à cette molécule, inhibe la prolifération des MDSC (Draghiciu *et al.*, 2015; Ko *et al.*, 2009).

Ensuite, d'autres signaux sont responsables de la conversion de ces cellules myéloïdes immatures en MDSC. Cette fois ce sont des facteurs tels que NF- κ B, STAT1, STAT6, PGE₂ et la cyclooxygénase 2 (COX2) qui sont impliqués (Condamine *et al.*, 2015). En effet, il a été montré qu'une fois activé par l'IL-1 β ou l'IFN- γ , STAT1 induit la sécrétion d'iNOS et d'ARG1 par les MDSC qui inhibent donc l'activité des L_T (Kusmartsev *et al.*, 2005). L'IL-1 β est également impliqué dans l'activation des MDSC via la voie NF- κ B (Tu *et al.*, 2008). L'activation des MDSC est donc médiée par les cytokines qui sont produites par d'autres cellules immunitaires activées. Selon la littérature, différentes cytokines semblent être impliquées dans l'activation des MDSC. L'IFN- γ par exemple, est sécrétée par les cellules NK et les L_T activés, et induit l'expression de iNOS par les MDSC (Shime *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). L'IL-4 et l'IL-13 sécrétées par les cellules Th2 et les cellules NK, sont également impliquées dans l'activation des MDSC. En effet, le récepteur à l'IL-4 (CD124) étant retrouvé à la surface de ces cellules, le rôle de cette cytokine a été étudié. Dans un modèle murin de myocardite virale, l'IL-4 induit chez les MDSC CD11b⁺/Ly6C⁺ (monocytaire-MDSC), l'expression de l'ARG1 (Zhang *et al.*, 2017). D'autres molécules jouent un rôle dans l'activation des MDSC, telles que l'IL-1 β , la PGE₂ (Poschke and Kiessling, 2012). La PGE₂ étant

elle-même produite par les MDSC, il est donc probable qu'une rétroaction positive existe, et permette de maintenir les cellules activées et là où elles ont été recrutées (Millrud *et al.*, 2016).

Cependant, il semblerait que l'activation des MDSC soit un phénomène plus complexe, puisqu'une étude a montré que la présence de L_T activés était nécessaire au maintien du phénotype immature des MDSC et à leurs activités immunosuppressives (Solito *et al.*, 2011). Dans cette étude, ils démontrent que les L_T les plus fortement activés sont plus facilement inhibés par les MDSC, suggérant l'existence de facteurs produits par les L_T activés (tels que l'IFN-γ) contribuant à l'activation des MDSC.

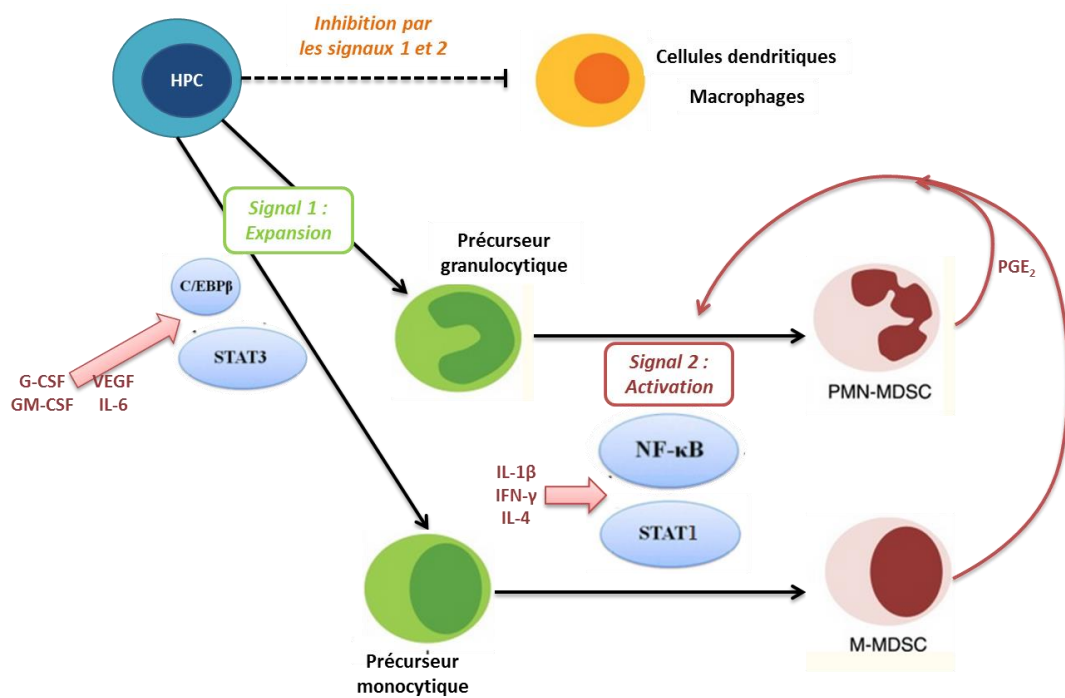


Figure 5 : La différenciation des MDSC régulée par différents signaux : Les MDSC sont issues de Cellules Progénitrices Hématopoïétiques (HPC). La présence de facteurs tumoraux (Signal 1) conduit à l'expansion des précurseurs monocytiques et granulocytiques. Ceux-ci requièrent l'activation du signal 2 pour acquérir le phénotype immunosuppresseur des PMN-MDSC et M-MDSC. Ces 2 signaux inhibent également la différenciation des cellules myéloïdes en cellules matures : cellules dendritiques et macrophages (modifié d'après Condamine *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2018).

I.8. Plasticité des MDSC

La plasticité des MDSC est un mécanisme complexe et largement discuté dans les modèles tumoraux de souris. Les MDSC peuvent se différencier en DC, macrophages et granulocytes. Des études *in vitro* ont montré que des MDSC provenant de souris porteuses de tumeurs sont capables, sous l'influence de GM-CSF, de se différencier en granulocytes pour les G-MDSC ou en DC et macrophages pour les M-MDSC (Narita *et al.*, 2009; Youn *et al.*, 2012). Ces derniers ont une activité immunosuppressive sur les L_T *in vitro*. Plusieurs rapports ont en effet décrit que les M-MDSC peuvent se différencier en *Tumor Associated Macrophages* (TAM) sous l'influence de l'*Hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF-1 α) (Corzo *et al.*, 2010; Marvel and Gabrilovich, 2015). En analogie avec les M-MDSC, les PMN-MDSC (ou G-MDSC) peuvent se différencier en *Tumor Associated Neutrophils* (TAN) (Fridlender *et al.*, 2012). Ces cellules jouent différents rôles dans la progression de la tumeur en induisant l'angiogénèse, la croissance tumorale et en induisant une immunosuppression locale. Elles stimulent l'apoptose des L_T et soutiennent l'immunosuppression dans le microenvironnement via des mécanismes communs aux MDSC, dont l'ARG1, l'iNOS et la production de cytokines (Kusmartsev and Gabrilovich, 2006; Sharda *et al.*, 2011).

Il existe peu de littérature sur la plasticité des MDSC dans des conditions non néoplasiques inflammatoires, telles que des maladies auto-immunes ou les infections. Une étude a cependant démontré que les MDSC provenant de moelle osseuse de souris atteintes d'arthrite peuvent se différencier en ostéoclastes sous l'influence de M-CSF et du *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* (RANKL) (Zhang *et al.*, 2015). Dans un autre modèle murin de polyarthrite rhumatoïde, Sendo et son équipe ont montré que les M-MDSC se différencient en DC tolérogéniques grâce au GM-CSF, qui sont capables d'inhiber les L_T , diminuant ainsi la progression de la maladie (Sendo *et al.*, 2017).

I.9. MDSC et pathologies

Comme évoqué dans de multiples conditions pathologiques, telles que les cancers, la transplantation d'organe et les maladies auto-immunes, la population de MDSC augmente en taille, et peut être détectée dans le sang, la rate, les tissus cancéreux et les sites



d'inflammation. Il n'est par ailleurs pas évident que les MDSC aient les mêmes fonctions dans toutes ces conditions.

1.9.1. MDSC et environnement tumoral

Les MDSC représentent un marqueur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer. En effet, le taux de MDSC chez des patients avec différents types de tumeurs solides est significativement augmenté (Safarzadeh *et al.*, 2017). Nous retrouvons aussi une augmentation de ces populations dans le sang de patients atteints de cancers hématologiques, tel que les DLBCL (Azzaoui *et al.*, 2016). Par ailleurs, plusieurs études montrent que les proportions de MDSC circulantes sont corrélées avec l'état clinique du patient, la survie globale, le nombre de métastases et l'échappement à l'immunité anti-tumorale (Azzaoui *et al.*, 2016; Diaz-Montero *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Il a donc été suggéré d'utiliser le taux de MDSC circulantes comme un marqueur prédictif de la réponse aux traitements par chimiothérapie, et plusieurs essais cliniques sont en cours afin d'en étudier la pertinence (suivi de la fréquence de MDSC chez des patients atteints de mélanome (NCT02332642) ou de cancer rénal (NCT02664883)).

La capacité des MDSC à participer à la croissance tumorale et à la formation de métastases peut être divisée en plusieurs fonctions.

- Régulation de l'immunité anti-tumorale : Les MDSC protègent les cellules cancéreuses de l'immunité anti-tumorale, grâce à leurs actions inhibitrices sur l'activation et la prolifération des L_T et des cellules NK (Sleeman, 2012). Différents mécanismes d'immunosuppression utilisés par les MDSC ont été mis en évidence dans les cancers, dont la production de ROS, la déplétion en nutriments via l'ARG1 ou encore la production d'IL-10 (Talmadge and Gabrilovich, 2013). Grâce à ces actions, les MDSC créent un microenvironnement suppresseur favorable à la croissance tumorale en maintenant l'auto-tolérance.

- Régulation de l'invasion tumorale : Les MDSC peuvent produire de grande quantité d'enzymes protéolytiques telles que la Métalloprotéinase-9 (MMP-9). Ces protéases facilitent l'invasion des cellules tumorales dans les tissus et également l'échappement à travers les capillaires, permettant la dissémination des cellules tumorales



(Page-McCaw *et al.*, 2007). Les MDSC sont capables d'induire la transition des cellules cancéreuses d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux conduisant à l'invasion de la tumeur dans les tissus (Binsfeld *et al.*, 2016; Toh *et al.*, 2011).

- Formation d'une niche pré-métastatique : Les MDSC et notamment les PMN-MDSC participent à la formation d'une niche pré-métastatique en fournissant un microenvironnement immunodéprimé adapté à l'arrivée et à la colonisation des cellules tumorales (Hood *et al.*, 2011). Par ailleurs, la MMP-9 provoque la restructuration du collagène des vaisseaux sanguins, mécanisme essentiel à l'extravasation des cellules tumorales présentes dans le sang (Tjiu *et al.*, 2009). Les MDSC peuvent induire l'expansion de cellules souches cancéreuses via les voies de signalisation IL-6/STAT3 et NO/NOTCH (Peng *et al.*, 2016).

- Régulation de l'angiogenèse : Les MDSC peuvent sécréter plusieurs facteurs favorisant l'angiogenèse : le TGF- β , le VEGF, la MMP9. Cette dernière lorsqu'elle est produite par les MDSC, déclenche la production de facteurs pro-angiogéniques et notamment de VEGF (Motalebnezhad *et al.*, 2016). Les MDSC expriment aussi le VEGF et le *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2) de façon STAT3-dépendante, résultant en la néo-vascularisation (Kujawski *et al.*, 2008). Le développement de nouveaux vaisseaux sanguins va faciliter l'apport en nutriment à la tumeur et sa progression.

Les différents rôles pro-tumoraux des MDSC dans les cancers solides sont représentés dans la **Figure 6**.

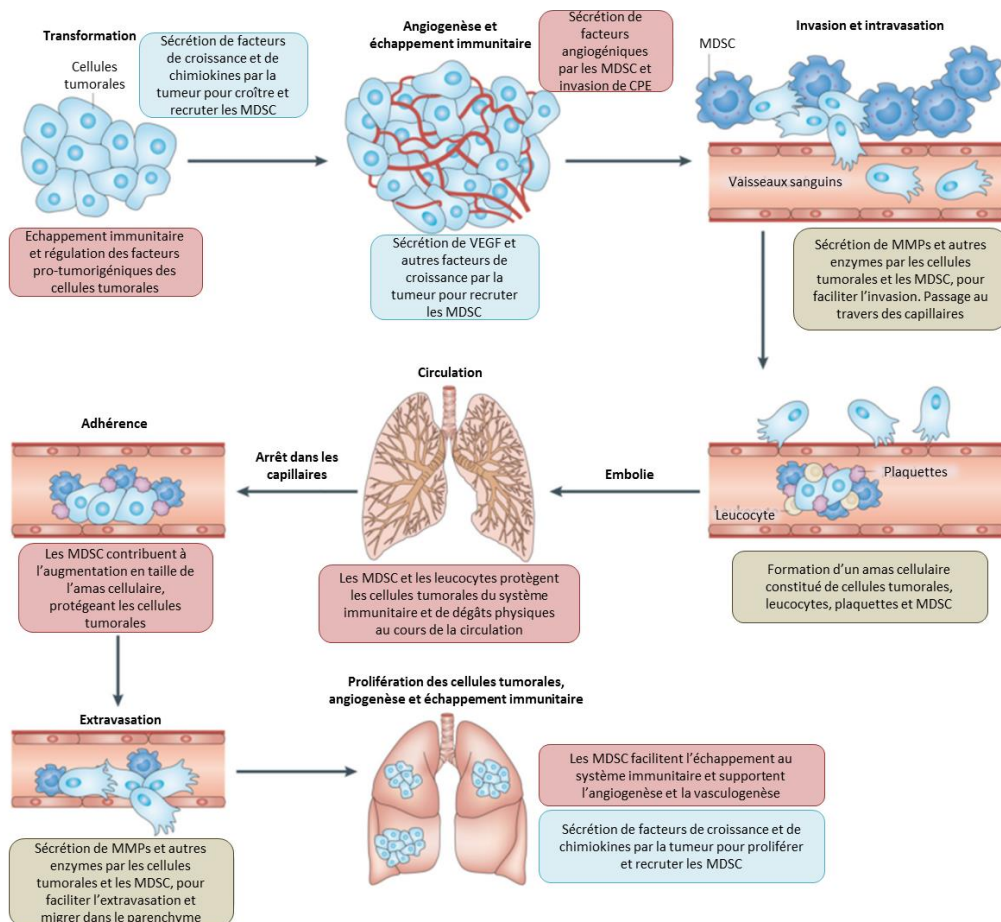


Figure 6 : Les rôles pro-tumoraux associés aux MDSC dans les cancers solides (Talmadge and Gabrilovich, 2013) : Rôles des cellules tumorales sont indiqués en bleu et ceux des MDSC et autres cellules myéloïdes sont indiqués en rouge (CPE : Cellules Progénitrices Endothéliales).

1.9.2. MDSC et maladies inflammatoires

Contrairement aux cancers, seules quelques données, parfois même contradictoires, sont disponibles concernant le rôle des MDSC dans les maladies auto-immunes et inflammatoires non néoplasiques. L'influence des MDSC a été rapportée dans différentes pathologies (Boros *et al.*, 2016).

Dans les pathologies pulmonaires telles que l'asthme, une étude sur un modèle murin a montré que les MDSC ont un effet anti-inflammatoire, puisqu'elles produisent des NO, inhibant la prolifération des L_T , et recrutent des Treg dans les poumons (Deshane *et al.*, 2011). Chez l'homme, il a été montré que les MDSC sont retrouvées en plus grande quantité

dans les lavages broncho-alvéolaires de patients asthmatiques comparés à des sujets sains (Deshane *et al.*, 2015). Dans le cadre de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), les MDSC sont retrouvées en grande quantité dans les voies respiratoires inférieures de patients et ont une activité inhibitrice sur les L_T (Deshane *et al.*, 2015; Scrimini *et al.*, 2013). Scrimini et son équipe montrent en plus l'effet du tabac sur la circulation des MDSC dans le sang en comparant des patients fumeurs actifs et d'anciens fumeurs.

Dans un modèle murin d'inflammation rénale chronique, les G-MDSC sont trouvées en grande quantité dans le rein après un traitement de glucocorticoïdes (Li *et al.*, 2015). Elles sont capables de supprimer l'inflammation locale en contrôlant l'expansion des L_T , des DC et en réduisant l'infiltration des macrophages dans le rein. Le transfert adoptif de ces G-MDSC confirme le rôle protecteur face à l'inflammation rénale.

Chez l'homme, il a été montré que la fréquence de MDSC $CD11b^+$, $CD33^+$, $HLA-DR^{low/-}$ dans le sang était augmentée chez les patients atteints de diabète de type I par rapport à des individus sains. Ces cellules ont une activité suppressive sur les L_T , et auraient donc une influence anti-inflammatoire dans la pathologie (Whitfield-Larry *et al.*, 2014).

Chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, le nombre de MDSC circulantes est augmenté comparé à des sujets sains, et la fréquence de ces cellules est négativement corrélée aux taux de *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) plasmatique (Jiao *et al.*, 2013). Dans cette étude, les MDSC ont donc un effet suppresseur protecteur. Cependant, il a récemment été montré un effet pro-inflammatoire des MDSC dans l'arthrite rhumatoïde, à la fois chez la souris et chez l'homme. La fréquence des MDSC est corrélée à la sévérité de la maladie en induisant une réponse inflammatoire Th17 (Guo *et al.*, 2016).

Par ailleurs, des modèles murins expérimentaux de maladies inflammatoires des intestins (MICI), ont montré que le transfert adoptif de G-MDSC ($CD11b^+$ $Gr-1^+$ $Ly6G^+$) réduit l'inflammation intestinale et les taux de TNF- α et IFN- γ dans les tissus coliques (Guan *et al.*, 2013). Le taux de MDSC aux capacités immunosuppressives dans le sang de patients atteints de MICI est d'ailleurs augmenté comparé à des sujets sains (Haile *et al.*, 2008).

Dans l'ensemble de ces pathologies inflammatoires non néoplasiques, les MDSC auraient plutôt un effet protecteur. Les rôles des MDSC ainsi que leurs phénotypes impliqués dans les différentes pathologies, sont listés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**):



Tableau 2 : Rôles des MDSC dans différentes pathologies inflammatoires non néoplasiques.

Pathologie	Espèce	Phénotype des MDSC	Fonction	Effet
Asthme	Souris	- Ly6C ⁺ Ly6G ⁻ - Ly6C ⁻ Ly6G ⁺	Diminution de la prolifération des L _T , recrute des Treg	Anti-inflammatoire
	Homme	CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD16 ⁻ HLA-DR ⁻	Production de NO inhibant la prolifération des L _T	Anti-inflammatoire
BPCO	Homme	Lin ⁻ CD11b ⁺ CD33 ⁺ HLA-DR ⁻	Diminution de l'expression de CD3ζ sur les L _T circulants	Anti-inflammatoire
Inflammation rénale chronique	Souris	CD11 ⁺ Gr1 ⁺	Inhibition de la prolifération des L _T , DC et infiltration des macrophages dans le rein	Anti-inflammatoire
Diabète de type I	Homme	CD11b ⁺ , CD33 ⁺ , HLA-DR ^{low/-}	Inhibition <i>in vitro</i> de la prolifération des L _T	Anti-inflammatoire
Arthrite rhumatoïde	Homme	- CD14 ⁻ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺ - CD33 ⁺ CD11b ⁺	- Corrélation négative avec le taux de TNF-α - Corrélation avec la sévérité de la maladie	- Anti-inflammatoire - Pro-inflammatoire
	Souris	CD11 ⁺ /Gr-1 ⁺	Corrélation avec la sévérité de la maladie	Pro-inflammatoire
MICI	Homme	CD14 ⁺ HLA-DR ^{low}	Inhibition <i>in vitro</i> de la prolifération et de la production d'IFN-γ des L _T	Anti-inflammatoire
	Souris	CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ Ly6G ⁺	Réduit l'inflammation intestinale et le taux de TNF-α et d'IFN-γ dans les tissus coliques	Anti-inflammatoire



1.9.3. MDSC, transplantations de CSH et GvHD

Le G-CSF est un facteur de croissance hématopoïétique permettant principalement de stimuler au sein de la moelle osseuse la croissance, mais aussi la différenciation de précurseurs de lignées myéloïdes (Deotare *et al.*, 2015). Cette cytokine est également connue pour ses effets sur la mobilisation des cellules-souches hématopoïétiques (CSH) depuis la moelle osseuse vers le compartiment du sang (Tay *et al.*, 2017). Parmi ces CSH, la moelle va relarguer des MDSC. En effet, de multiples études ont démontré l'incidence du G-CSF sur la mobilisation au niveau périphérique de MDSC. Luyckx *et al.* ont montré que les pourcentages de PMN-MDSC (Lin⁻ HLA-DR⁻ CD11b⁺ CD15⁻) et de M-MDSC (Lin⁻ HLA-DR⁻ CD11b⁺ CD15⁺) sont significativement augmentés dans le sang de patients sous G-CSF (Luyckx *et al.*, 2012).

A la suite d'une greffe de CSH, dans le cadre de troubles hématologiques comme par exemple la leucémie, certaines complications peuvent survenir chez le receveur. En effet, nous connaissons déjà les rejets de greffes classiques, où le greffon est reconnu et détruit, car considéré comme du « non-soi » par le système immunitaire de l'hôte. La *Graft versus Host Disease* (GvHD) est une pathologie pouvant survenir à la suite d'une greffe de CSH provenant d'un donneur génétiquement non compatible avec le receveur. Dans ce cas, les cellules immunocompétentes du greffon vont cibler les tissus de l'hôte conduisant à des lésions tissulaires sévères. Le rôle des MDSC en tant qu'immuno-modulateur dans les greffes de CSH a donc été étudié.

Une analyse sur 62 patients ayant reçu des cellules souches périphériques, issues de donneurs traités au G-CSF, a permis de mettre en évidence qu'un fort nombre absolu de M-MDSC et PMN-MDSC contenu dans le greffon était corrélé à une réduction importante de GvHD (Lv *et al.*, 2015). De façon plus précise, Vendramin *et al.* ont montré sur 60 patients que la quantité de M-MDSC était le seul paramètre permettant de prédire la survenue de GvHD (Vendramin *et al.*, 2014). En effet dans leur étude, le taux de GvHD 180 jours post-transplantation est diminué à 22% chez les receveurs de greffons ayant une quantité de M-MDSC supérieure à la médiane, au lieu de 63% quand la quantité de M-MDSC dans le greffon est inférieure à la médiane.

Le rôle des MDSC dans le greffon semble toutefois plus complexe; une étude rétrospective sur 51 patients greffés et développant une GvHD aigüe, a montré que la

fréquence de MDSC dans le sang était augmentée et associée à une dysfonction des L_T *in vitro* (Mougiakakos *et al.*, 2013). La GvHD est toutefois à distinguer de la GvHD aigüe, puisqu'elle survient très tôt, contrairement à la GvHD qui peut survenir plusieurs mois après la greffe, et qui est alors parfois qualifiée de chronique.

Une étude sur un modèle murin de GvHD, a pu montrer que des cellules myéloïdes immatures ($CD11b^+ Gr1^+$) issues de souris donneuses traitées au G-CSF, étaient capables de supprimer les GvHD en utilisant le mécanisme de l'IDO permettant de cataboliser le tryptophane (Joo *et al.*, 2009). *A contrario*, Highfill et son équipe ont quant à eux montré que les MDSC induites *in vitro* étaient capables d'inhiber les L_T alloréactifs grâce à leur activité ARG1 (Highfill *et al.*, 2010). De plus, lorsque ces cellules sont stimulées avec de l'IL-13, ils ont observé une réduction de la mortalité due à la GvHD, tout en préservant l'effet *Graft versus Leukemia* (GvL) des L_T .

1.9.4. MDSC et infections bactériennes

Récemment la présence des MDSC a été étudiée dans d'autres conditions que le cancer et notamment dans les infections.

Dans le sepsis, les MDSC ont d'abord été retrouvées dans un modèle murin de sepsis polymicrobien (Delano *et al.*, 2007). Dans cette étude, il a été montré une augmentation significative de cellules $Gr-1^+ CD11b^+$ dans la rate, les ganglions et la moelle osseuse. Par ailleurs, ils ont montré que ces cellules étaient capables d'inhiber la production d'IFN- γ par les $L_T CD8^+$ et dans une moindre mesure d'inhiber la prolifération des $L_T CD4^+$. A la suite de ces résultats, plusieurs études ont montré que ces MDSC étaient également augmentées dans le sang de patients atteints d'un sepsis (Guérin *et al.*, 2014; Janols *et al.*, 2014). L'étude de Guérin *et al.*, réalisée au laboratoire, montre aussi que la présence de ces cellules, capables d'inhiber les L_T *in vitro*, est corrélée à la lymphopénie.

Quelques années plus tard, Uhel et son équipe ont montré que la présence de PMN-MDSC dans le sang de patients septiques était corrélée à une plus forte incidence d'infections nosocomiales (Uhel *et al.*, 2017). Cette étude montre que ces MDSC sont capables d'inhiber les L_T par la production d'ARG1. Pour la première fois, les MDSC dans le sepsis sont associées à l'état d'immunosuppression observable chez les patients.



Plus récemment, Mathias *et son équipe* ont mis en évidence à la fois une augmentation de MDSC chez les patients en choc septique et les patients en sepsis sévère (Mathias *et al.*, 2017). Dans cette étude, la présence de MDSC est corrélée à des complications cliniques telles que des infections nosocomiales augmentant le temps d'hospitalisation et la mortalité, confirmant les résultats de Uhel *et al.*

Cependant leurs rôles dans les infections aiguës bactériennes, comme le sepsis, ne sont toujours pas bien compris. La fonction majeure des MDSC dans le sepsis et le choc septique, est probablement de réguler l'hyper-inflammation en participant au syndrome *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome* (CARS), il a toutefois été suggéré que les MDSC ont une action antimicrobienne (Janols *et al.*, 2014). En effet, il a été montré que des MDSC issues de souris infectées à *M.tuberculosis*, présentaient des capacités phagocytaires et endocytaires d'une manière dose-dépendante (Knaut *et al.*, 2014).

1.9.5. MDSC et infections virales

Les MDSC ont été également identifiées dans des infections virales, telles que le virus de l'hépatite C (VHC) ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), mais aussi dans des infections fongiques et parasitaires (Gama *et al.*, 2012; Goh *et al.*, 2013; Rieber *et al.*, 2015; Tacke *et al.*, 2012; Van Ginderachter *et al.*, 2010). Dans ces études le phénotype de MDSC identifié semble être différent en fonction du type d'infection et du stade de la maladie (Janols *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2013).

Les infections virales sont connues pour induire des médiateurs pro-inflammatoires, tels que le TNF- α et l'IL-1 β , associés à l'accumulation de MDSC (Goh *et al.*, 2013). En effet, la fréquence de MDSC est augmentée chez des patients positifs pour l'VHC, et est positivement corrélée à la charge virale (Tacke *et al.*, 2012). Les infections au virus de l'hépatite B (VHB) sont également associées à une induction de MDSC, qui sont retrouvées augmentées dans le sang de patients atteints d'une infection chronique à l'VHB (Huang *et al.*, 2014a). Ces MDSC sont d'ailleurs capables dans ces deux études de supprimer *in vitro* l'activité des L_T. Enfin, plusieurs études ont montré que les patients positifs pour le VIH montrent une augmentation du nombre de MDSC dans leur sang (Gama *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2013). Une



de ces études observe l'activité ARG1 des MDSC, qui sont donc capables de supprimer l'activité des L_T , et corrèle le taux de M-MDSC avec le stade de la maladie (Qin *et al.*, 2013).

Par ailleurs, la présence de cellules myéloïdes $CD11b^+$ ayant des capacités suppressives via iNOS et ARG1 sur les L_T , ont été retrouvées chez des patients avec une infection récente au virus de la grippe A (Virus Influenza A), confirmant les résultats réalisés sur des souris (De Santo *et al.*, 2008). Il semblerait donc que les MDSC soient présentes lors d'infections virales chroniques telles que l'infection par le VIH, le VHB et le VHC, mais aussi transitoires comme le virus de la grippe.

I.10. MDSC et approches thérapeutiques

Un grand nombre d'études ont démontré un intérêt quant à l'élimination des MDSC dans les modèles de tumeurs. En effet, que ce soit la chimiothérapie qui augmente l'immunité anti-tumorale en contrant l'activité immunosuppressive des MDSC sur les L_T , ou les vaccins tumoraux qui permettent la conversion des MDSC en cellules pro-inflammatoires qui limitent la croissance tumorale, la réduction du nombre de MDSC dans le cancer est sans aucun doute bénéfique. Plusieurs molécules visant à moduler les MDSC ont été testées. Parmi elles, les inhibiteurs de COX-2 (tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens de la famille des coxibs) bien connus pour réduire l'incidence de nombreux cancers, en induisant des changements transcriptionnels, diminuent l'expression des MDSC au niveau des tumeurs (Goh *et al.*, 2013). Les inhibiteurs de phosphodiesterase-5 (tels que le sildénafil ou le tadalafil) empêchent le fonctionnement de la machinerie cellulaire en diminuant l'expression d'ARG1 et d'iNOS. Certains agents peuvent induire la différenciation des MDSC en cellules myéloïdes matures, tels que le paclitaxel ou les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (oligonucléotides CpG) (Sevko *et al.*, 2013).

En outre, l'utilisation thérapeutique des MDSC représente une approche prometteuse dans le cadre de certaines pathologies. Ces cellules immuno-régulatrices représentent, au même titre que les cellules Treg, un nouveau type cellulaire pouvant être manipulé dans le but d'induire une tolérance immune lors d'une transplantation ou d'une maladie auto-immune. Un rôle protecteur des MDSC a en effet été décrit dans le cadre de transplantations allogéniques (Drujon *et al.*, 2014).



Enfin, un certain nombre d'essais cliniques chez des patients utilisant ou visant les MDSC ont été rédigés (22 essais cliniques en cours de réalisation ou achevés selon www.clinicaltrials.gov, Mai 2018). 80% de ces essais cliniques s'effectuent chez des patients atteints de cancers (cancers solides ou hématologiques), chez lesquels les MDSC sont utilisés comme biomarqueurs de l'évolution de la maladie (NCT02332642 : suivi des MDSC dans le mélanome) ou encore chez lesquels l'impact des chimiothérapies ou immunothérapies est observé sur les MDSC (NCT03486119 : effet d'un anti-PD-1 sur les MDSC dans un cancer du poumon). Un essai clinique de phase I chez des patients atteints de cancer a récemment montré qu'un agoniste des récepteurs LXR (*Liver X Receptor*, récepteurs des oxystérols, récepteurs nucléaires régulant le métabolisme du cholestérol et des lipides dans l'organisme ainsi que la réponse inflammatoire au niveau des macrophages) diminue la survie des MDSC induisant une déplétion des MDSC dans le sang de ces patients (Tavazoie et al., 2018). Cette déplétion en MDSC est associée à une activation des $L_T CD8^+$.

Les essais cliniques restants concernent des pathologies inflammatoires et/ou des infections ; parmi elles se trouve notre étude où les MDSC sont étudiées dans le cadre du sepsis (NCT02903082).

Chapitre II. Le sepsis

II.1. Introduction

Le mot « Sepsis » vient du grec « σήψις » qui signifie « putréfaction », c'est-à-dire la décomposition d'une matière organique en présence de bactéries. Le sepsis est le terme international pour caractériser une réponse inflammatoire généralisée, associée à une infection grave (Funk *et al.*, 2009; Steven M. Opal, 2009). Ce syndrome était anciennement désigné par le terme septicémie créée en 1837 par le médecin français Pierre-Adolphe Piorry, qui décrit la présence de bactéries dans le sang (bactériémie) (Pierre-A Piorry, 1834; Sakula, 1979). Quelques années plus tard, en 1878, Semmelweis et Pasteur apportent avec la « théorie des germes », la notion d'empoisonnement du sang par un micro-organisme (Fekete, 1968; Funk *et al.*, 2009).

Notre système immunitaire peut être vu comme un état d'équilibre entre la réponse pro-inflammatoire, indispensable à l'élimination de germes, et la réponse contraire, anti-inflammatoire destinée à prévenir des dégâts collatéraux sur les tissus et liée à une sur-activation de la réponse pro-inflammatoire. Un déséquilibre entre ces deux mécanismes peut entraîner un dérèglement important et délétère du système immunitaire que l'on définit par syndrome septique. Le sepsis est donc l'expression clinique d'anomalies physiologiques et biochimiques induites par une infection.

II.2. Définitions

II.2.1. Anciennes définitions

En 1991, un consensus international définit initialement le sepsis comme résultant d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), suite à une infection de l'organisme (Bone *et al.*, 1992). Le SIRS est caractérisé par au moins deux des manifestations cliniques suivantes :



- (1) une température corporelle supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C,
- (2) une fréquence cardiaque supérieure à 90 battements par minute,
- (3) une tachypnée ou hyperventilation, définit par une fréquence respiratoire >20 cycles /min ou une PaCO₂ < 32 mmHg,
- (4) un compte leucocytaire supérieur à 12 000/mm³ ou inférieur à 4 000/mm³.

Le sepsis était alors défini par l'association de deux critères de SIRS et d'une infection bactérienne ou autre (fongique, virale, parasitaire) présumée ou confirmée. Il peut se compliquer par l'apparition de défaillances d'organes prenant alors le terme de sepsis sévère, qui peut lui-même progresser en choc septique, définit comme une «hypotension artérielle induite et persistante malgré une expansion volémique adéquate».

En 2001, l'*International Sepsis Definition Conference* ajoute au SIRS le concept de stadification, à l'image du TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*) en oncologie, et basé sur 4 caractéristiques bien distinctes, portant l'acronyme de PIRO. P représente ici les prédispositions au sepsis, c'est-à-dire les comorbidités préexistantes capables de réduire la survie du patient. I est l'infection, et reflète l'impact sur le pronostic qu'ont le site, le type et l'étendue de l'infection ainsi que du pathogène impliqué. R représente dans cet acronyme la réponse de l'organisme face à un pathogène et dont le SIRS fait partie. Enfin, le O signifie dysfonction d'organe, puisque la sévérité des atteintes et le nombre d'organes concerné est déterminant dans le pronostic (Levy *et al.*, 2003). Chaque caractéristique a un nombre de points donnés : P = 9, I = 4, R = 6 et O = 14 ; le score total P + I + R + O détermine la sévérité du sepsis, et donne le risque de mortalité qu'a le patient. Ainsi, plus le score PIRO est élevé, plus le risque de mortalité est important (Howell *et al.*, 2011).

Cependant, les critères du SIRS n'indiquent pas nécessairement une réponse immunitaire anti-bactérienne inappropriée puisque ce syndrome peut être retrouvé dans de nombreux contextes non-infectieux tels que les traumatismes graves, les pancréatites et les grands brûlés. Récemment, une large étude prospective a confirmé le manque de sensibilité et de spécificité du SIRS vis-à-vis de l'infection. Selon cette étude, un patient sur huit présentait moins de deux critères du SIRS alors qu'il présentait un sepsis sévère, c'est-à-dire un sepsis avec défaillance d'organes (Kaukonen *et al.*, 2015). Il a donc été décidé de retirer le SIRS de la définition des syndromes septiques.



II.2.2. Place du score SOFA dans la nouvelle définition du sepsis

Dans le but de décrire la gravité et les défaillances d'organe liées au sepsis, la Société Européenne de la Médecine de Soins Intensifs (ESCIM) a créé le score *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) (Vincent *et al.*, 1996). Le score SOFA est défini selon plusieurs paramètres cliniques et biologiques résumés dans le tableau ci-dessous (

Tableau 3) :

Tableau 3 : Le score SOFA (d'après Vincent *et al.*, 1996) : PaO₂ : Pression artérielle en oxygène, FiO₂ : Fraction inspirée d'oxygène, MAP : Pression Artérielle Moyenne, Score de Glasgow avec un minimum de 3 points jusqu'à un score maximum de 15 indiquant une fonction neurologique normale, Catécholamine (dopamine, noradrénaline...) en µg/kg/min.

SOFA Score	0	1	2	3	4
Respiration Ratio PaO ₂ /FiO ₂	≥ 400	<400	<300	<200	<100
				Assistance respiratoire	
Coagulation Plaquettes, 10 ³ /mm ³	≥ 150	<150	<100	<50	<20
Hépatique Bilirubine, mg/dL	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	> 12,0
Cardiovasculaire Hypotension	MAP ≥70mmHg	MAP <70mmHg	Catécholamine ≤ 5	Catécholamine > 5	Catécholamine >15
Système nerveux central Score de Glasgow	15 Conscience normale	13 – 14 Somnolence / coma léger	10 – 12	7 – 9 Coma lourd	< 6 Coma profond ou mort
Fonction rénale Créatinine, mg/dL	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9	> 5,0

Le score SOFA est établi en additionnant la valeur donnée pour chaque organe, en sachant qu'une valeur de 0 constitue la normalité et qu'une valeur de 4 définit la défaillance d'organe la plus sévère (Singer *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 1996).

Dans le cadre de ces nouvelles définitions, le *quick SOFA* (qSOFA) est un score plus rapide mais moins précis que le score SOFA. Il permet d'identifier très rapidement les patients à risque de présenter un sepsis grâce à l'analyse de 3 paramètres cliniques : la fréquence respiratoire, l'état mental du patient (score de Glasgow) et la pression artérielle (Singer *et al.*, 2016).

Le score SOFA permet de décrire la gravité du sepsis, et d'évaluer les dysfonctions de chaque organe. Le taux de mortalité est directement lié à la gravité du sepsis et donc au score SOFA. En effet, une étude rétrospective sur 184 875 patients a montré qu'une augmentation du score SOFA d'au moins 2 points est associée à un risque de mortalité plus élevé, d'environ 10% selon les études (Raith *et al.*, 2017; Seymour *et al.*, 2016).

En 2014, la ESCIM établit une nouvelle définition du sepsis, puis en 2016 (Singer *et al.*, 2016). Désormais le sepsis se définit comme une dysfonction d'organe suite à une réponse immunitaire inappropriée de l'hôte lors d'une infection. En pratique, le sepsis correspond à une augmentation d'au moins deux points du score SOFA en association à une infection suspectée ou confirmée. Le concept de sepsis sévère est abandonné. Le choc septique est quant à lui défini comme un sepsis au cours duquel il est noté une hyperlactatémie supérieure à 2 mmol/L et la nécessité d'un traitement par vasopresseur pour maintenir une pression artérielle moyenne > 65 mmHg.

La **Figure 7** ci-dessous représente le guide utilisé par les cliniciens dans le but d'identifier les patients septiques.

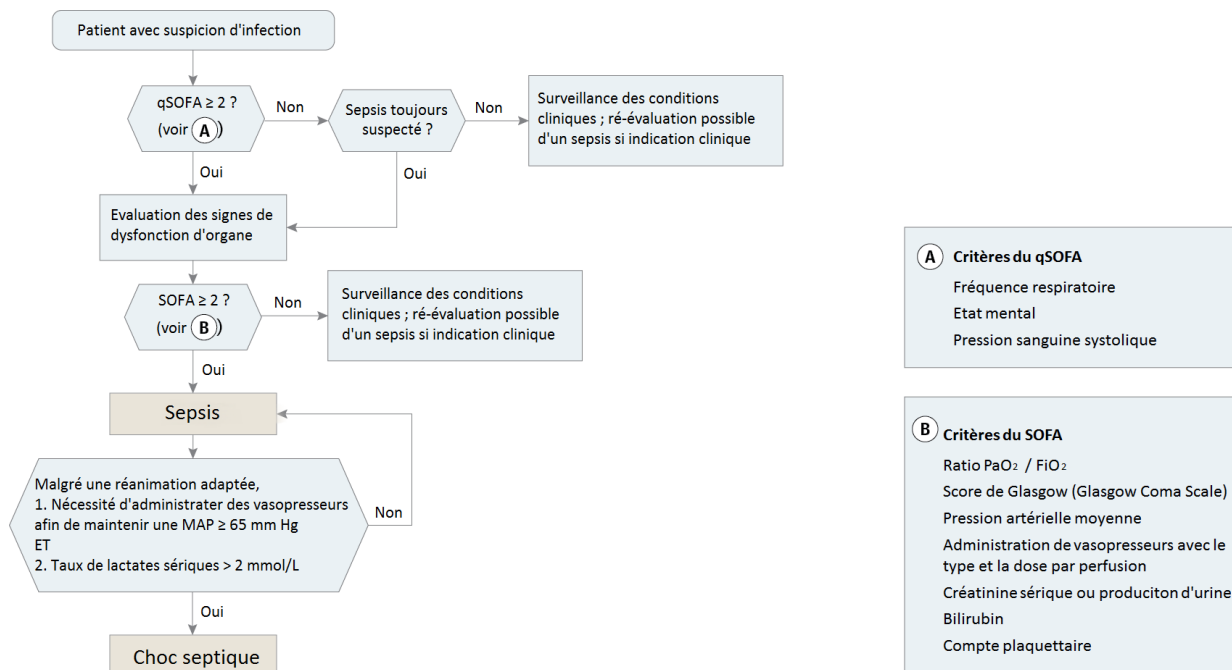


Figure 7 : Guide d'identification des critères cliniques des patients septiques (modifié d'après Singer et al., 2016). Les scores SOFA doivent être considérés comme nuls, sauf s'il est avéré que le patient présente un dysfonctionnement d'organe préexistant avant le début de l'infection. (MAP : pression artérielle moyenne).

II.3. Epidémiologie

Après le premier consensus de 1991, la standardisation du diagnostic du sepsis a permis la réalisation d'études épidémiologiques, d'incidence et de mortalité. Ainsi, Martin *et al.* a observé une augmentation annuelle de l'incidence du sepsis aux Etats-Unis, passant de 83 cas en 1979, à 240 pour 100 000 habitants cas en 2000 (Martin *et al.*, 2003). De même en France, Annane *et al.* ont décrit une augmentation significative de la fréquence de chocs septiques entre 1993 et 2000, passant de 7 à 9,7 cas pour 100 hospitalisations en unité de soins intensifs (Annane *et al.*, 2003). En Allemagne, l'incidence des cas de sepsis entre 2007 et 2013 a augmenté de 256 à 335 cas pour 100 000 personnes (Fleischmann *et al.*, 2016). Plus largement, dans les pays à revenu national élevé, l'incidence du sepsis est de 288 pour 100 000 habitants, par an (Martin *et al.*, 2006).

Les syndromes septiques sont donc en constante augmentation. En cause, le vieillissement progressif de la population, une augmentation du nombre de comorbidités,



une amélioration du diagnostic ou encore le développement par les pathogènes de résistances aux antibiotiques.

A contrario, une réduction de la mortalité du sepsis est observée aussi bien aux Etats-Unis, qu'en France, puisque le taux de mortalité dans les unités de soins intensifs français a chuté de 56% à 35% entre 1993 et 2001 (Annane *et al.*, 2003; Brun-Buisson *et al.*, 1995). Plus récemment aux Etats-Unis, le taux de mortalité dans les unités de soins intensifs a chuté de 35% entre 1988 et 2012, passant de 17,3% à 11,3% (Zimmerman *et al.*, 2013). L'amélioration en termes de rapidité et de sensibilité du diagnostic permet une prise en charge adaptée du patient, diminuant ainsi la mortalité. En revanche, le taux de mortalité reste élevé (jusqu'à 80%) dans les pays à revenu national faible et intermédiaire (Schultz *et al.*, 2017).

II.4. Facteurs associés au sepsis

Plusieurs facteurs de risque ont été retrouvés. L'avancée en âge représente un facteur de risque majeur avec une augmentation continue de la fréquence du sepsis notamment après 60 ans (Martin *et al.*, 2006). Le risque de développer un sepsis est également augmenté en présence de comorbidités telles qu'une insuffisance rénale, une maladie pulmonaire chronique, un cancer ou une immunosuppression (Brun-Buisson *et al.*, 1995; Suarez De La Rica *et al.*, 2016). Le site d'infection est aussi déterminant ; en effet, les poumons et l'abdomen sont les sites initiaux d'infections mis en cause dans les sepsis, les plus fréquents, selon une étude dans une unité de soins intensifs chinoise (He *et al.*, 2016). La saisonnalité peut être importante, puisque certaines infections comme les infections pulmonaires sont plus fréquentes en hiver (Danai *et al.*, 2007; Suarez De La Rica *et al.*, 2016). Enfin, le sexe joue également un rôle, notamment via l'action des hormones. Une incidence plus faible de sepsis a été rapportée chez les femmes, probablement due à l'effet protecteur des estrogènes sur le système immunitaire, déjà connu dans les pathologies cardiovasculaires (Angele *et al.*, 2014).



II.5. Biomarqueurs

Plusieurs biomarqueurs sont utilisés en cliniques afin d'aider au diagnostic et de prédire l'état du patient. La procalcitonine (PCT) est une protéine libérée par les cellules du parenchyme du tissu lésé en réponse à une agression bactérienne. La sécrétion de PCT commence dès les premières heures du sepsis (2-4h), et le pic est atteint à 24-48h. Plusieurs études, et notamment celle de De Jong E *et al.*, ont montré que la diminution du taux de PCT est associée à un faible taux de mortalité (de Jong *et al.*, 2016). Si la PCT n'est pas augmentée lors d'une inflammation virale ou non-infectieuse, le taux de cette protéine peut être élevé dans d'autres conditions non-septiques telles que les chocs cardiogéniques ou des pancréatites sévères, constituant ainsi un manque de spécificité de ce marqueur (Meisner, 2014).

Le lactate est un marqueur des conditions hypoxiques souvent retrouvées chez les patients dans un état critique. Le suivi des lactates sériques permet d'apprécier l'efficacité d'un traitement chez le patient septique (Miglietta *et al.*, 2015; Rhodes *et al.*, 2017).

La protéine C-Réactive (CRP) est synthétisée lors de la phase aiguë d'une infection ou de l'inflammation, par le foie. La spécificité de cette protéine pour le diagnostic du sepsis est faible puisqu'elle est synthétisée à la suite de différents stimuli autres que le sepsis ; il s'agit en effet d'un marqueur de l'inflammation (Rhodes *et al.*, 2017).

La PCT et la CRP sont normalement des biomarqueurs de diagnostics, mais leurs dosages sont peu prescrits du fait de leur manque de spécificité vis-à-vis du sepsis. Quant aux lactates sériques, ils représentent un marqueur aspécifique de la gravité, car une élévation de leurs taux sériques ne reflète pas de façon systématique la sévérité de la pathologie. Le suivi de ces paramètres a donc ses limites, et il serait nécessaire de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs adaptés.

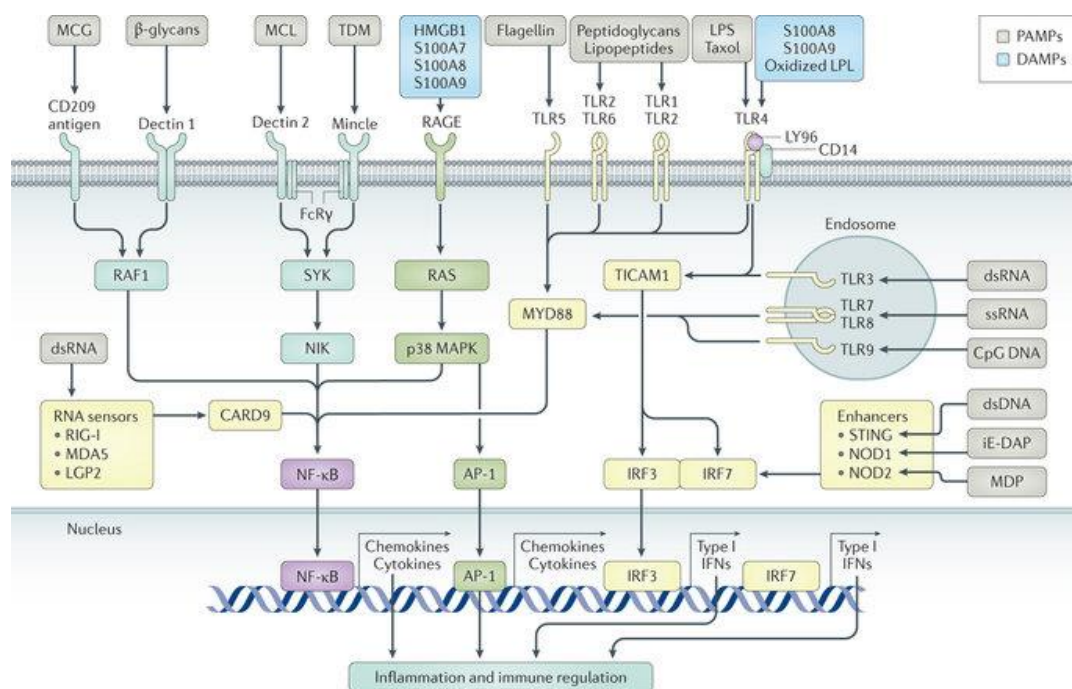


II.6. Physiopathologie

II.6.1. Inflammation

Le sepsis est une maladie inflammatoire médiée par l'activation du système immunitaire inné par un pathogène (bactérie le plus souvent). En effet, le sepsis est initié par la reconnaissance de pathogènes et de signaux de danger, par les cellules immunes, mais aussi les cellules épithéliales et endothéliales. La liaison des PAMPs des micro-organismes (bactéries, virus...) ou des *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) aux protéines du complément ou des TLR, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors* (NLR), *Retinoic acid-Inductible Gene (RIG)-like receptors* (RLR) et *C-Type Lectin receptors* (CLR), induit une cascade de signalisation intracellulaire. L'activation des voies de signalisations MAPKs (*Mitogen-Activated Protein kinases*), JAKs (Janus Kinase), STATs et NF- κ B conduit à l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire, l'inflammation et l'immunité adaptative, comprenant notamment la production de cytokines inflammatoires (TNF- α , IFN de type I, IL-6, IL-8) et de chemokines (CCL2, CXCL10) (**Figure 8**). L'activation de ce réseau de cytokines inflammatoires commence dans les minutes suivant la reconnaissance des PAMPs et DAMPs. Grâce à ces molécules chimioattractives, les cellules de l'immunité sont recrutées au niveau du site infectieux. Parmi ces cellules, les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA), dont les monocytes, macrophages et cellules dendritiques (DC) font partie, vont phagocyter les pathogènes. Après la phagocytose, les CPA effectuent le processing des protéines du pathogène (lipopolysaccharides, peptidoglycanes des parois bactériennes par exemple), c'est-à-dire la fragmentation de ces protéines en peptides qui sont ensuite associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) –I ou –II. Ensuite, les L_T reconnaissent les complexes CMH-peptides grâce aux TCR à leur surface. Ces L_T activés vont développer à la fois une réponse pro-inflammatoire, afin de lutter contre le pathogène, et une réponse anti-inflammatoire servant de rétrocontrôle négatif pour réguler l'activité du système immunitaire inné.





Nature Reviews | Disease Primers

Figure 8 : Récepteurs de surface et intracellulaire responsables de la reconnaissance de pathogènes et de signaux de dangers endogènes (Hotchkiss et al., 2016).

Le plus souvent, le système immunitaire inné est efficace, élaborant une réponse équilibrée et protectrice, et résultant en l'élimination du pathogène à l'aide de réactions pro-inflammatoires, telles que la libération de cytokines et chemokines, le recrutement de phagocytes et l'activation locale du complément et du système de coagulation. Au cours d'une infection locale, la réponse inflammatoire contrôle la progression du pathogène. L'inflammation est donc un évènement essentiel dans l'immunité innée. Le retour à l'homéostasie qui suit est médié par des mécanismes compensatoires qui par rétrocontrôle négatif ont pour effet de limiter l'inflammation initiale et de prévenir les dommages collatéraux. Si ce mécanisme est perturbé, une hyper inflammation peut survenir, avec ce qui est appelé un orage de cytokine, pouvant conduire à de multiples dysfonctions d'organe. Au cours de certaines infections, le pathogène prédomine et réussit à se multiplier malgré l'activation de la réponse immune, qui devient alors déséquilibrée et néfaste pour l'hôte. Cette réaction est caractéristique du syndrome du choc toxique (TSS), où le super antigène du *Staphylococcus aureus* (entérotoxine B) force l'interaction entre le CMH-II et le TCR, induisant une activation massive et non spécifique des lymphocytes par l'antigène (Figure 9).

L'hyper-inflammation, médiée en partie par la libération de cytokines pro-inflammatoires, par l'activation du système de coagulation, et par le système du complément, est caractérisée par une souffrance cellulaire (résultant en la libération de DAMPs), des dysfonctions d'organe, et un catabolisme.

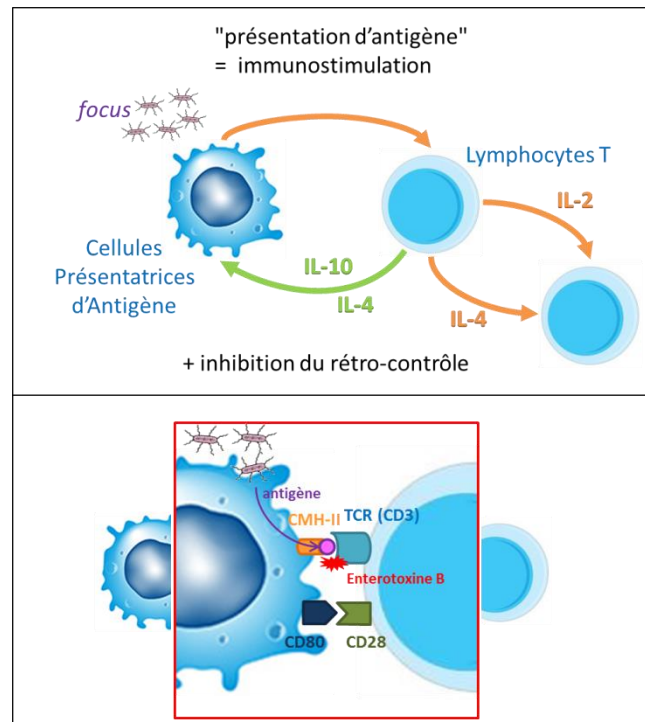


Figure 9 : Schéma simplifié de la régulation des interactions entre les CPA du système immunitaire inné, et les L_T naïfs du système immunitaire adaptatif. L'interaction APC – cellules T implique plusieurs récepteurs : CMH II et le TCR, CD80 et CD28. Les supers antigènes (entérotoxine B) sont capables de tromper ce système en contournant ces mécanismes inhibiteurs et induisent ainsi une hyper-inflammation et un orage de cytokine (Gerlach, 2016).

II.6.2. Immunosuppression

Bien que la réponse inflammatoire systémique soit considérée comme caractéristique du sepsis, les mécanismes de rétrocontrôle se mettent rapidement en place et prennent une place importante dans la physiopathologie du sepsis. Ainsi, l'immunosuppression survient quasi concomitamment à l'inflammation, au cours du sepsis. Le *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome* (CARS) est initialement décrit en

1996 par Bone (Ward *et al.*, 2008). Il s'agit d'une désactivation systémique du système immunitaire permettant de restaurer l'homéostasie à partir d'un état inflammatoire, le SIRS. Cette réponse anti-inflammatoire existerait donc uniquement pour équilibrer la réponse pro-inflammatoire. La réponse CARS a été caractérisée ces dernières années par différents éléments cliniques, cellulaires et moléculaires (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des effets cellulaires, moléculaires et cliniques du Syndrome de Réponse Anti-inflammatoire Compensatoire (CARS) au cours d'un sepsis (d'après Ward *et al.*, 2008).

Éléments cellulaires et moléculaires
<ul style="list-style-type: none"> • Dysfonction des lymphocytes (réduction de la prolifération et/ou la production de cytokines) • Apoptose des lymphocytes • Régulation négative du marqueur HLA-DR des monocytes • Production d'IL-10, de TGF-β, de PGE₂
Éléments cliniques
<ul style="list-style-type: none"> • Anergie cutanée • Hypothermie • Leucopénie, susceptibilité aux infections secondaires et incapacité à éliminer un pathogène

Cette immunosuppression affecte à la fois le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Elle est marquée entre autres par une lymphopénie par l'apoptose des L_B, L_T et la réduction de leur prolifération, l'expansion de cellules T régulatrices et de MDSC, la reprogrammation des CPA conduisant à une diminution de l'expression du HLA-DR, un phénotype immature des neutrophiles. Ces derniers subissent également des dysfonctions, altérant leurs capacités anti-microbiennes, comme par exemple une diminution de la production des ROS ou la baisse de leur activité chimiotactique, via une diminution de l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 (Cummings *et al.*, 1999; Hotchkiss

et al., 2013). Il est également observé au cours du CARS, une réduction de la capacité des monocytes à produire des cytokines pro-inflammatoires. Les MDSC ainsi que les neutrophiles vont d'ailleurs produire des cytokines anti-inflammatoires telles que la PGE₂ ou encore le TGF- β et l'IL-10, deux cytokines immunosuppressives capables d'induire des Treg. Enfin, le sepsis induit également l'augmentation de l'expression du PD-L1 à la surface des cellules stromales et des CPA, qui va se lier au PD-1 exprimé par les lymphocytes T, supprimant leur fonction.

La forte apoptose des lymphocytes T, B et des DC explique aussi l'immunosuppression des patients ; le taux d'apoptose de ces cellules est d'ailleurs corrélé à la sévérité du sepsis, et la persistance de la lymphopénie prédit la mortalité (Hotchkiss *et al.*, 1999a). La phagocytose des cellules en apoptose induit le relargage de TGF- β et d'IL-10. Drewry A et son équipe, ont montré qu'une lymphopénie persistante 4 jours après le diagnostic du sepsis est prédictive d'une mortalité à la fois précoce et tardive, mais aussi du développement d'infections secondaires (Drewry *et al.*, 2014).

Ces modifications de l'immunité adaptative en réponse au sepsis contribuent à la réactivation de virus latents. En effet, comparé à des individus contrôles, les patients septiques ont une augmentation du taux d'ADN viral dans le sang. Walton A *et al.* ont montré la détection dans le sang de patients septiques, de différents ADN viraux entre 77,5% et 14,1% : le Torque Teno Virus (TTV), le Cytomégalovirus (CMV), le Virus d'Epstein-Barr (EBV) et le Virus Herpès Simplex (HSV). Ces patients qui présentent une virémie ont également une augmentation du nombre d'infections secondaires (Walton *et al.*, 2014).

La **Figure 10** ci-dessous représente le modèle actuel des conséquences cliniques possibles au cours du sepsis (Hotchkiss *et al.*, 2016). Les patients guéris peuvent rapidement sortir de l'hôpital (ligne bleue). Certains patients rencontrent une réponse hyper-inflammatoire prononcée et non contrôlée, conduisant à de multiples dysfonctions d'organe et à la mort du patient (ligne rouge). D'autres patients survivent à cette inflammation précoce, mais rencontrent un syndrome chronique grave (ligne verte) caractérisé par le syndrome *Persistent Inflammation/Immunosuppression and Catabolism Syndrome* (PICS). C'est au cours de cette phase que peuvent survenir des réactivations virales, des infections secondaires ou/et des dommages fonctionnels à long terme. En revanche, le PICS associé à



l'inflammation est caractérisé par l'augmentation de la concentration de la protéine C réactive, et la libération de cellules myéloïdes immatures.

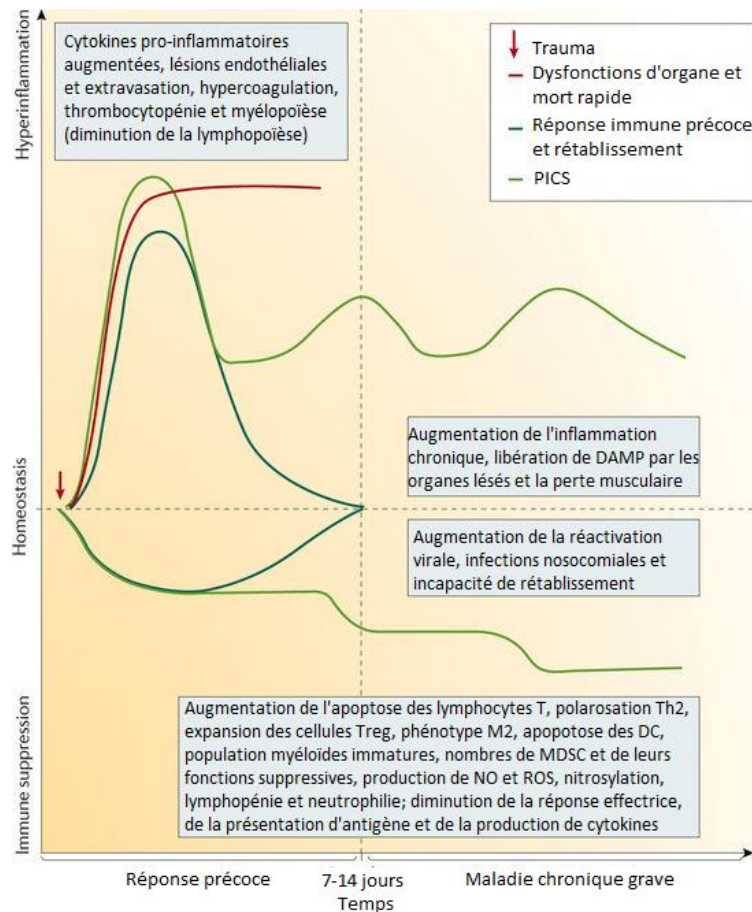


Figure 10 : Modèle actuel des conséquences cliniques possibles au cours du sepsis (modifié d'après Hotchkiss et al., 2016).

II.7. Modèles murins

Dans le but de comprendre au mieux la physiopathologie du sepsis, et de développer de nouvelles approches thérapeutiques, des modèles murins ont été créés. Différentes procédures ont été développées : l'administration de toxines exogènes telles le lipopolysaccharide (LPS) ou encore l'administration directe de pathogènes. Le modèle de ponction-ligature caecale (CLP) chez la souris est aujourd'hui le plus utilisé. Malgré les réserves liées à la transposition de l'animal à l'homme, ces modèles sont essentiels à la

bonne compréhension de la physiopathologie du sepsis, ainsi qu'à toutes démarches thérapeutiques.

II.7.1. Modèle non chirurgical

L'administration d'endotoxine est une façon d'obtenir rapidement des symptômes et anomalies biologiques comparables à ceux observés chez un patient septique (Remick *et al.*, 2000). Différents agents peuvent être utilisés : le LPS, qui est un élément de la membrane des bactéries Gram négatives, les ADN CpG, le zymosane, qui est une molécule de la membrane des levures, et d'autres peptides (Nemzek *et al.*, 2008). Ils sont généralement administrés en une seule dose, par voie intraveineuse ou intra-péritonéale. Après injection chez les souris, les signes cliniques apparaissent rapidement, incluant une léthargie plus ou moins importante et une hypothermie (Remick *et al.*, 2000). D'un point de vue biologique, on retrouve une diminution du compte leucocytaire, avec réduction du nombre absolu de lymphocytes et de neutrophiles. Le modèle de sepsis induit par le LPS (isolé et purifié d'*Escherichia.coli*) est très utilisé puisque simple et reproductible, cependant cette « inflammation stérile » ne reflète qu'une seule voie d'activation, celle de NF- κ B, induite par l'intermédiaire du TLR4.

L'injection directe du pathogène est également une alternative comme modèle non chirurgical. Ce modèle est quant à lui très dépendant du site d'infection, du pathogène, et de la « taille » de l'*inoculum* ; en effet, ces paramètres vont définir la progression et les conséquences cliniques sur l'animal (Nemzek *et al.*, 2008). De plus, même si la souche et la dose de pathogène peuvent être standardisées, l'administration soudaine d'une seule espèce de pathogène est peu représentative du sepsis chez l'homme.

II.7.2. Modèle chirurgical

En 1980, Wichterman et ses collaborateurs ont mis au point le modèle de ponction-ligature caecale (CLP) (Wichterman *et al.*, 1980). D'un point de vue physiopathologique, le modèle de CLP est plus proche du sepsis chez l'homme que l'injection d'agents pathogènes. Ce modèle est une association de trois agressions : une atteinte tissulaire liée à l'incision de la paroi abdominale, la nécrose induite par la ligature du *caecum*, et enfin l'infection

secondaire causée par la dissémination des bactéries de la flore intestinale dans le péritoine. Le niveau de ligature du *caecum* est déterminant dans la gravité du sepsis : une ligature courte entraîne un sepsis modéré, alors qu'une ligature plus haute (près de la base du *caecum*) provoque un sepsis grave et rapidement mortel (**Figure 11** et **Figure 12**) (Hubbard *et al.*, 2005; Rittirsch *et al.*, 2009). Ce modèle permet de recréer la libération progressive des médiateurs de l'inflammation et ainsi d'observer une augmentation des concentrations plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α) et activation du complément (Rittirsch *et al.*, 2007). Les manifestations cliniques apparaissent dans les 12 à 24h après l'opération, et sans intervention, la CLP entraîne une morbidité (état de maladie) progressive dans les trois premiers jours (Ebong *et al.*, 1999).

Malgré une grande analogie avec le sepsis de l'homme, le modèle de CLP présente toutefois des biais d'interprétation. En effet, le niveau de ligature, la taille de l'aiguille, et le type de ponction effectuée, sont tous des points importants jouant sur la pathologie développée par l'animal et son pronostic (Rittirsch *et al.*, 2009). La question de la reproductibilité entre différentes études peut alors naturellement se poser.

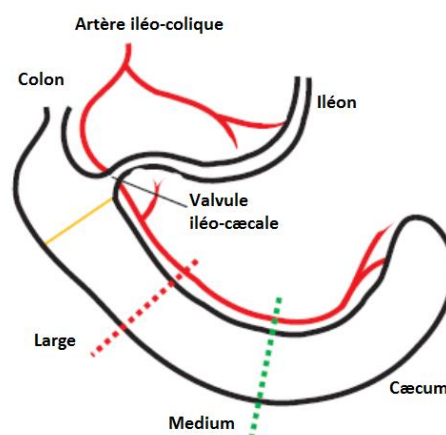


Figure 11 : Localisation anatomique de la CLP chez la souris (modifié d'après Rittirsch *et al.*, 2009): Le niveau de ligature du caecum détermine la gravité du sepsis. Une ligature courte, représentée par des pointillés verts, entraîne un sepsis modéré. Une ligature plus haute représentée par des pointillés rouges (près de la base du caecum représentée par un trait jaune) provoque un sepsis grave.

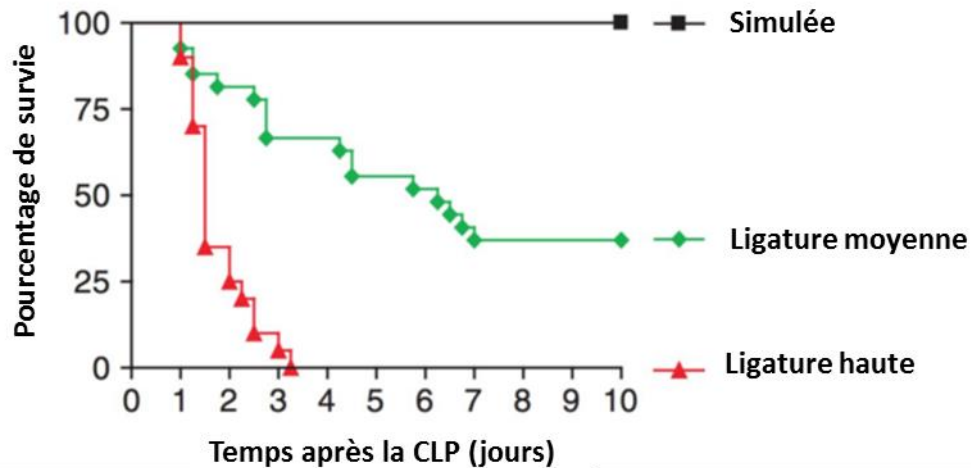


Figure 12 : Courbes de survie après CLP chez la souris, selon le niveau de ligature (modifié d'après Rittirsch *et al.*, 2009) : les souris « simulées » ont été anesthésiées et leur paroi abdominale a été incisée, sans manipulation du caecum.

II.8. Physiopathologie cellulaire

Au niveau cellulaire, nous observons de nombreuses dysfonctions, résumées dans la **Figure 13**. Il s'agit par exemple, d'une libération excessive de molécules toxiques telles que les ROS, par les neutrophiles, la modification d'expression de marqueurs de surface, tels que le HLA-DR sur les monocytes ou l'augmentation de l'expression du CD64 (aussi connu comme récepteur Fc-gamma 1 : FcγRI) par les granulocytes, ou encore de l'apoptose massive d'un grand nombre de types cellulaires.

II.8.1. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des composants du système immunitaire inné et sont en première ligne lors d'une infection. La réponse engendrée par les neutrophiles est bénéfique au patient et permet l'élimination du pathogène.

Ils sont capables de produire un grand nombre de ROS principalement en utilisant la NADPH-oxydase (Birben *et al.*, 2012). Les ROS peuvent être relargués à l'extérieur de la cellule au niveau du site d'infection ou dans des phagolysosomes à l'intérieur de la cellule après phagocytose de la bactérie. Une fois dans le milieu extracellulaire, les ROS vont créer

un stress oxydatif, toxique pour les cellules (pathogènes et cellules de l'hôte) et provoquer des dommages sur l'ADN, les protéines et les lipides de la membrane (Girotti, 1985; Lambeth, 2004). Les ROS permettent donc l'élimination du pathogène mais causent des dommages collatéraux sur les cellules voisines, pouvant conduire à grande échelle à une destruction tissulaire (nécrose).

Les neutrophiles ne sont pas épargnés par les effets du sepsis et leurs capacités anti-microbiennes peuvent être affectées. Une réponse trop faible des neutrophiles engendre également des conséquences. Il a été montré chez des patients ayant un sepsis sévère, que l'expression de récepteurs aux chimiokines, et notamment CXCR2, est significativement diminuée (Cummings *et al.*, 1999). Les neutrophiles sont alors moins présents au niveau du site d'infection. Une étude a aussi montré que les patients neutropéniques ont un risque augmenté de sur-infections (Lekstrom-Himes and Gallin, 2000). La difficulté est donc de définir un seuil entre réponse appropriée et réponse excessive des neutrophiles face à un pathogène (Brown *et al.*, 2006).

Au cours du sepsis nous observons également la présence dans le sang de granulocytes immatures caractérisés par une faible expression des marqueurs CD10 et CD16 et ayant des fonctions immunosuppressives (Guérin *et al.*, 2014). Ces neutrophiles sont également associés à une augmentation de la mortalité (Daix *et al.*, 2018).

II.8.2. Les monocytes et macrophages

Les monocytes et les macrophages sont également perturbés lors d'un sepsis. La capacité des monocytes à sécréter des cytokines pro-inflammatoires est grandement diminuée en réponse à un pathogène (Cavaillon and Adib-Conquy, 2006). Cela conduit en partie au phénomène de tolérance, défini par une augmentation de la sécrétion de médiateurs immunosuppressifs, principalement l'IL-10, et à la diminution de l'expression du HLA-DR (Monneret *et al.*, 2004). En effet, la capacité des monocytes et des macrophages à présenter l'antigène aux cellules de l'immunité adaptative, est médiée par le HLA-DR. La faible expression de ce marqueur par les monocytes est d'ailleurs un marqueur d'anergie et d'immunosuppression dans le sepsis, puisqu'elle est associée à un risque accru d'infections secondaires et à une mortalité plus élevée (Landelle *et al.*, 2010).

Enfin, les monocytes sont une source importante de l'IDO (*Indoleamine 2, 3-dioxygenase*) responsable de la catalyse du tryptophane, acide aminé essentiel à la prolifération des L_T . Tattevin *et al.*, ont montré que la concentration plasmatique d'IDO est corrélée à la sévérité du sepsis, et que les patients septiques qui décèdent ont des taux plasmatiques d'IDO plus élevés, comparés aux patients survivants (Tattevin *et al.*, 2010).

II.8.3. Les lymphocytes

L'apoptose des lymphocytes au cours du sepsis est un phénomène aujourd'hui largement démontré puisque de nombreuses études indépendantes ont été réalisées sur des patients post-mortem (Felmet *et al.*, 2005; Hotchkiss *et al.*, 1999b; Toti *et al.*, 2004). Ce phénomène survient dans les différents organes lymphoïdes (rate, thymus et ganglions lymphatiques) (Hotchkiss *et al.*, 2001). La déplétion des lymphocytes dans les tissus est également accompagnée d'une diminution du nombre absolu de lymphocytes circulants. L'apoptose massive de toutes les populations de lymphocytes explique donc la lymphopénie caractéristique des patients septiques. Cette lymphopénie est associée, dans plusieurs études, à une augmentation de la mortalité et des infections secondaires (Daix *et al.*, 2018; Drewry *et al.*, 2014). Le nombre de L_T $CD4^+$ chez des patients septiques est souvent aussi faible que celui retrouvé chez des patients atteints de SIDA (Venet *et al.*, 2010). Le risque d'infections secondaires est donc nettement augmenté chez ces patients (Le Tulzo *et al.*, 2002).

Outre la réduction en nombre des L_T , cette population montre au cours du sepsis un profil d'épuisement ou « *exhausted* ». Cet état s'exprime par une réduction des fonctions effectrices des L_T , c'est-à-dire leur capacité à sécréter des cytokines (IFN- γ) (Wherry, 2011). Les L_T épuisés présentent un état transcriptionnel particulier, caractérisé par une signature d'expression génique bien spécifique, et notamment une expression altérée d'un grand nombre de gènes impliqués dans le chimiotactisme, l'adhésion et la migration des L_T (Icam2, Ccr7, CD62L...) (Wherry *et al.*, 2007). Les L_T vont également exprimer des marqueurs d'inhibition, tels que PD-1. La molécule PD-1 est exprimée sur les $CD4^+$ et $CD8^+$, et la signalisation par ce récepteur inhibe la prolifération des L_T , leurs productions de cytokines et leurs activités cytotoxiques. L'augmentation de l'expression de ce marqueur de co-stimulation négative à la surface des L_T est aujourd'hui bien connue, et est surtout associée à

un risque accru d'infections secondaires et une augmentation de la mortalité (Guignant *et al.*, 2011). De plus, les L_T épuisés subissent une restriction de la diversité du TCR. Une étude préliminaire a en effet mis en évidence une diminution transitoire de la diversité du répertoire du TCR, associée à une augmentation du nombre d'infections secondaires et de la mortalité (Venet *et al.*, 2013). Enfin, de nombreuses études ont montré une tendance vers un profil de Treg, puisqu'une augmentation des cellules Treg circulantes a été retrouvée chez les patients présentant une immunoparalysie suite à un sepsis (Monneret *et al.*, 2003; Venet *et al.*, 2009).

Au cours du sepsis, il est possible d'observer aussi bien dans des modèles murins que chez l'homme, une diminution nette du nombre de L_B due à l'apoptose (Venet *et al.*, 2010). Des études réalisées sur des souris déficientes en cellules B ont montré une augmentation de la mortalité lors de sepsis bactérien, ainsi qu'une réduction de la réponse inflammatoire (Kelly-Scumpia *et al.*, 2011). Les L_B ne sont pas épargnés par les effets du sepsis, puisqu'en plus de la réduction de leur nombre, la réponse antigène spécifique par les anticorps est d'efficacité diminuée (Mohr *et al.*, 2012). Cette « paralysie » des L_B peut aussi expliquer la survenue d'infections secondaires après un sepsis. En effet, des études sur des patients atteints de sepsis sévère ont montré que la concentration sérique en IgM était significativement diminuée et corrélée avec l'état clinique du patient (Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2016). Comme pour les L_T , la réponse des L_B est donc altérée au cours du sepsis et orientée vers un profil de paralysie cellulaire.

II.8.4. Autres cellules immunitaires

L'apoptose massive d'un grand nombre de types cellulaire est un phénomène majeur au cours du sepsis. En effet, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes sont toutes deux affectées par ce phénomène (Grimaldi *et al.*, 2011; Guisset *et al.*, 2007). Ajoutée à la diminution du nombre de DC circulantes due à l'apoptose, cette population voit également l'expression de son HLA-DR diminuée (Poehlmann *et al.*, 2009). Ainsi, au même titre que les monocytes, leur fonction de CPA est fortement altérée.

Les cellules NK sont aussi affectées par l'apoptose et leur nombre dans le sang est nettement diminué au cours d'un sepsis (Forel *et al.*, 2012). Leurs capacités à produire des



cytokines (IFN- γ), l'expression du TLR, ainsi que leurs fonctions cytotoxiques sont altérées, participant à la paralysie immunitaire face au pathogène (Souza-Fonseca-Guimaraes *et al.*, 2012).

II.8.5. Les cellules non immunitaires

Les autres cellules de l'organisme ne sont pas épargnées par les perturbations liées au sepsis. L'apoptose des cellules s'effectue par les voies intrinsèques (par la mitochondrie) ou extrinsèques via des récepteurs de mort (*First Apoptosis Signal* ou FAS, *Tumor necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand* ou TRAIL) (Hotchkiss *et al.*, 2000). Par ailleurs, d'autres mécanismes de mort cellulaire programmée peuvent être mis place, c'est le cas de la pyroptose et de la nécroptose (Jorgensen *et al.*, 2017).

Ainsi sont touchées par ces mécanismes de mort les cellules endothéliales, mais également les cellules intestinales, les cellules nerveuses et les cellules musculaires. Hotchkiss *et al.* ont montré par microscopies optique et confocale, et par immunohistochimie (marquage de la caspase-3 activée) une apoptose locale des cellules épithéliales intestinales chez des patients accidentés, et ce très rapidement après le stress (Hotchkiss *et al.*, 2000). Une autre étude a montré l'induction d'une apoptose intrinsèque des neurones de l'hypothalamus chez des rats pour qui un sepsis a été provoqué par ponction-ligature caecale (da Costa *et al.*, 2017). Enfin, les cellules musculaires subissent un stress dû à l'hypoxie de l'organisme, ce qui altère sévèrement le fonctionnement de leurs mitochondries. La régénération de ces cellules musculaires après un sepsis est diminuée et une étude récente sur un modèle murin a montré qu'elle pouvait être améliorée grâce à une greffe de cellules souches mésenchymateuses qui sont capables de transférer aux cellules souches musculaires, leurs mitochondries viables (Rocheteau *et al.*, 2015).

Lors du sepsis, l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales est augmentée telles que les intégrines et sélectines (sélectines E et P), conduisant à la fixation des leucocytes sur l'endothélium. Ceux-ci vont alors migrer par extravasation à travers cet épithélium altéré, et ainsi causer une fuite de fluide vasculaire (Hotchkiss *et al.*, 2016). L'ubiquité de ces protéines à travers les différents organes de l'organisme explique en partie, les atteintes des tissus distants du site d'infection, via le relargage systémique de cytokines et de médiateurs de l'inflammation.



L'endothélium endommagé va également exposer des protéines pro-coagulantes conduisant à l'activation des plaquettes, et de facteurs de coagulation. Cet état d'hypercoagulabilité (augmentation de la capacité du sang à coaguler) diminue le flux sanguin et induit donc une mauvaise perfusion tissulaire conduisant à l'hypoxie des organes (Remick, 2007). Secondairement à cette coagulopathie, une hémorragie incontrôlée peut survenir suite à la thrombocytopenie et la déplétion des protéines pro-coagulantes (Levi et al., 2013).

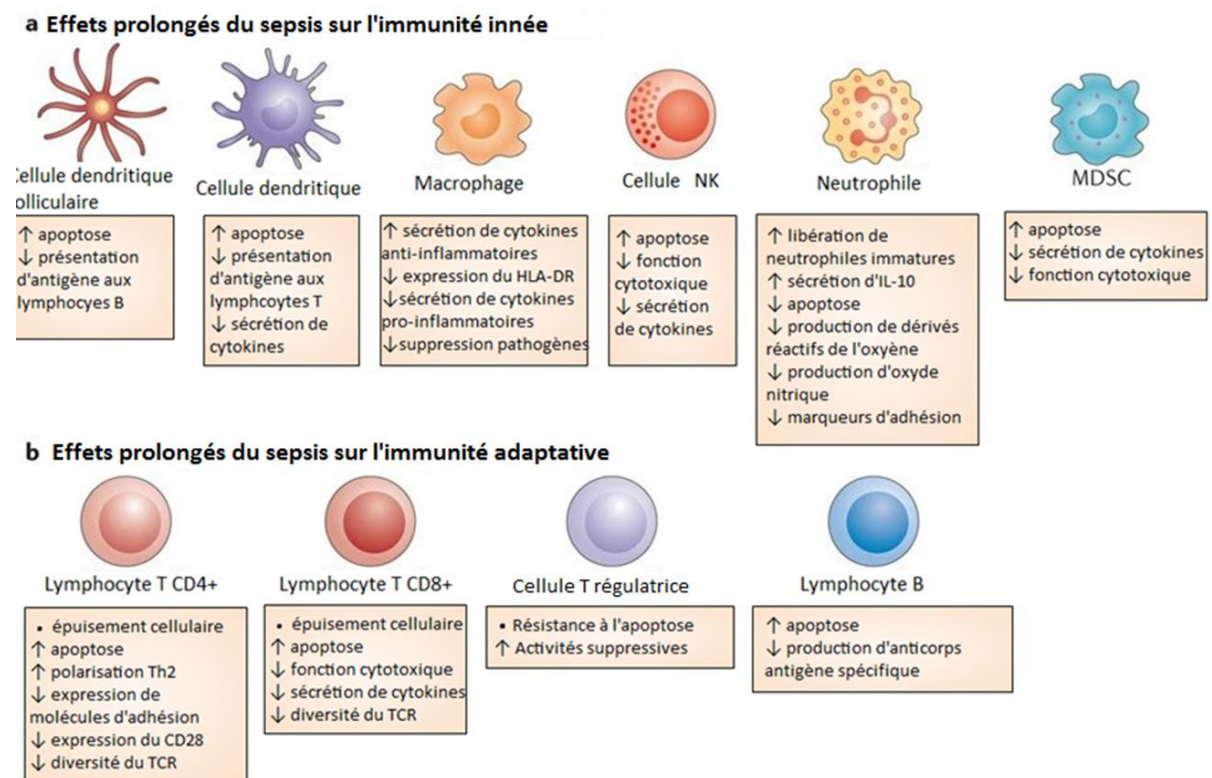


Figure 13 : Impact du sepsis sur les cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif (modifié d'après Hotchkiss et al., 2013).

II.9. Parallèle entre sepsis et cancer

Les maladies infectieuses et les cancers ont de nombreuses similarités (Hotchkiss and Moldawer, 2014) (**Figure 14**). En effet, les pathogènes et les cellules tumorales expriment différents types d'antigènes reconnus par les LT. La présence permanente de DAMPs et PAMPs dans les cancers et les infections, respectivement, entraîne une stimulation

chronique des cellules immunitaires puisqu'ils vont activer de façon continue les PRRs (Pattern Recognition Receptor). L'amplification de cette réponse va induire la libération de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que des ROS et NOS. Ces molécules altèrent les tissus et causent l'apoptose des cellules environnantes, résultant en une inflammation locale. La libération de médiateurs anti-inflammatoires, tels que l'IL-10 et le TGF- β par exemple, va se produire lors de la phagocytose de ces débris par les macrophages et les neutrophiles.

Dans les deux pathologies nous retrouvons des mécanismes qui vont contrebalancer l'inflammation induite par la reconnaissance des antigènes par les L_T, induisant ainsi un épuisement lymphocytaire ou « *T cell exhaustion* » (Hotchkiss and Moldawer, 2014). L'épuisement lymphocytaire est aussi bien retrouvé dans les stades avancés de cancer que dans les inflammations chroniques, et est caractérisé par différents processus, précédemment décrits (*paragraphe II.8.3. Les lymphocytes*). Dans cet environnement immunosuppresseur il est possible d'observer une augmentation du nombre de MDSC et de Treg. En effet, des études ont montré une augmentation du nombre de MDSC dans le sang à la fois chez des patients atteints de cancers et chez des patients septiques (Mathias *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018; Yamauchi *et al.*, 2018).

Dans les deux pathologies, la quantité de MDSC détectée est un indicateur du pronostic des patients. Un pourcentage élevé de MDSC dans le sang de patients septiques est associé à un risque accru d'infections secondaires, et d'une hospitalisation plus longue (Mathias *et al.*, 2017). De la même façon, le pourcentage de MDSC dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus est associé à la présence de métastases (Wu *et al.*, 2018).

Une augmentation de Treg a également été observée chez les patients atteints de cancer du poumon et des patients septiques (Kotsakis *et al.*, 2016; Zorio *et al.*, 2017); dans ces études, la présence de ces cellules est associée à la gravité de la pathologie (survie sans progression ou score SOFA élevé).

Il est également possible d'observer aussi bien dans les cancers que dans des infections sévères, l'expression de marqueurs d'inhibition par les cellules tumorales ou les cellules endothéliales, tels que PD-L1, qui une fois lié à son récepteur PD-1, induit l'anergie des L_T. L'expression de PD-L1 est augmentée à la surface des monocytes dans le sepsis, et est



associée à une mortalité plus élevée (Tai *et al.*, 2018). De même, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est à ce jour très bien démontrée (He *et al.*, 2015).

En tenant compte de ces informations, il est alors concevable d'utiliser certaines thérapies préconisées en oncologie (comme les anti-PD-L1), dans le cadre de sepsis.

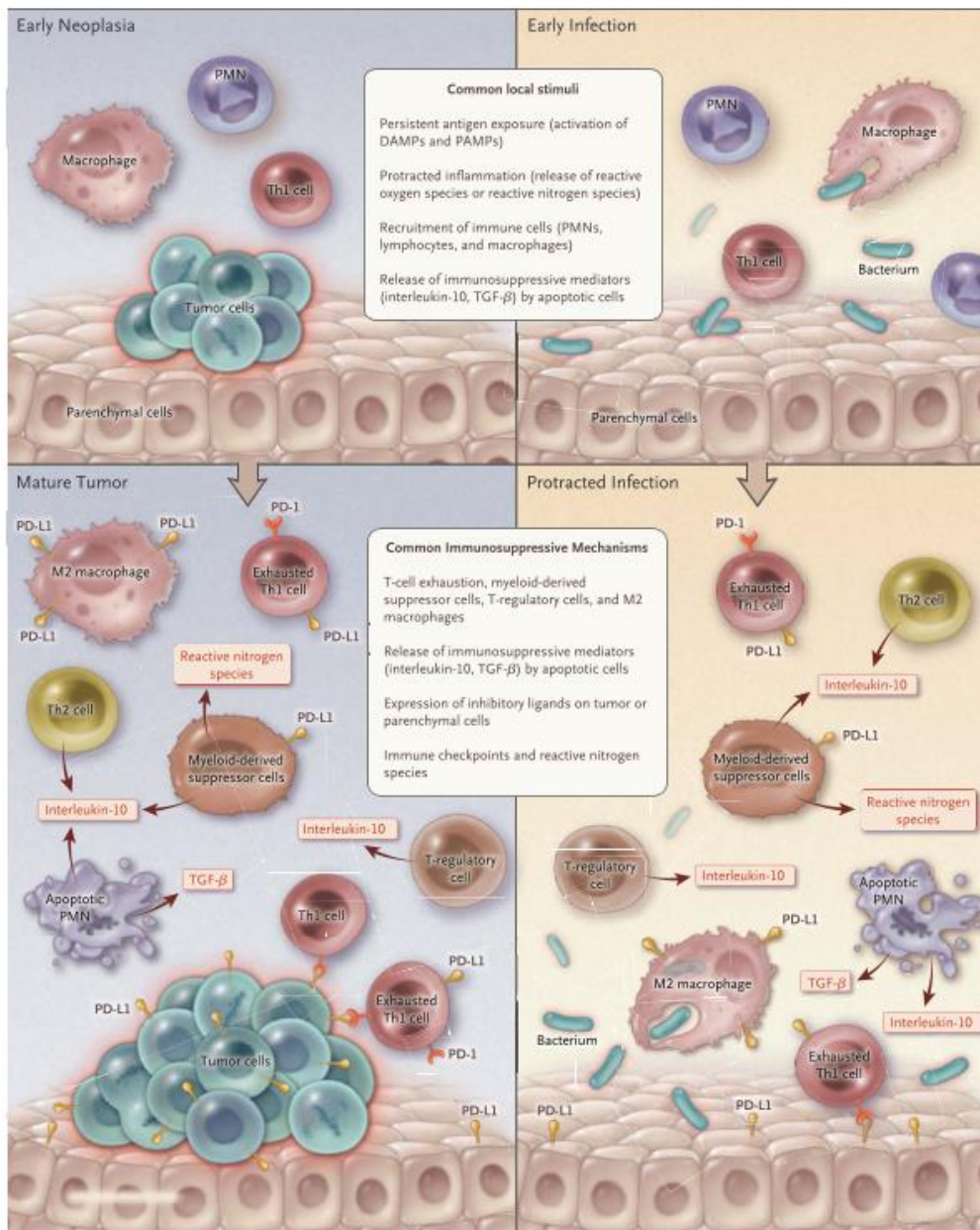


Figure 14: Parallèle entre les réponses immunitaires d'un cancer et celles d'une infection prolongée (Hotchkiss and Moldawer, 2014)

II.10. Thérapies

Le sepsis ou choc septique sont des urgences médicales ; le *Surviving Sepsis Campaign* (SSC), recommande qu'un traitement et une réanimation soient mis en place immédiatement après la prise en charge du patient à l'hôpital (Rhodes *et al.*, 2017).

II.10.1. Traitement classique

Le traitement classique consiste à cibler la source du sepsis, c'est-à-dire le pathogène. Pour cela la prise en charge consiste en l'administration d'un ou plusieurs antibiotiques à large spectre dans les plus brefs délais après le diagnostic du sepsis ou du choc septique. Ce traitement antibiotique sera ensuite adapté en fonction des résultats de cultures microbiologiques qui doivent être réalisées à l'arrivée du patient à l'hôpital (Rhodes *et al.*, 2017). Les molécules antibiotiques sont choisies en fonction du site d'infection, des sensibilités ou des résistances du pathogène. Toutefois, une thérapie à large-spectre peut être maintenue si plusieurs pathogènes ont été isolés. De plus un élément majeur de la prise en charge de ces patients, lorsque ceci est possible, est le contrôle de la source d'infection : par chirurgie ou la mise en place d'un système de drainage par exemple (Rhodes *et al.*, 2017).

Parallèlement, l'urgence est aussi de suppléer les défaillances d'organes. Il s'agit, par exemple, de l'utilisation de vasopresseurs chez les patients en hypotension sévère, d'une assistance ventilatoire mécanique chez les patients en détresse respiratoire, ou d'une transfusion de plaquettes lorsque le compte plaquettaire est faible, causant un risque sévère d'hémorragie (Rhodes *et al.*, 2017). En effet, le maintien de la volémie est indispensable à l'oxygénation tissulaire, et une hypovolémie représente un risque d'effondrement du débit cardiaque, de la pression artérielle et surtout de l'apport en oxygène aux organes. L'hypovolémie est une diminution de la masse sanguine et peut résulter d'une hémorragie, de la diminution de la masse plasmatique par extravasation d'eau et de sodium vers les tissus interstitiels. Le remplissage vasculaire est donc primordial à la survie du patient, et consiste à perfuser un soluté de remplissage (colloïdes ou cristalloïdes) par voie veineuse (Société Française d'Anesthésie et de Réanimation , 2015).



Ces assistances médicales permettent de sauver le patient sur l'instant, et sont donc supprimées à mesure du rétablissement.

II.10.2. Thérapies immuno-modulatrices

La réponse hyper-inflammatoire du sepsis est une cible thérapeutique majeure. De nombreux essais cliniques s'intéressent aux médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines (TNF- α , IL-1) (Hotchkiss *et al.*, 2016). Des études ont été réalisées sur l'efficacité des anti-TNF- α chez des patients en choc septique. Dans l'une de ces études, 1879 patients ont reçu soit un anticorps monoclonal anti-TNF- α soit un placebo, et aucun effet bénéfique sur la survie à 28 jours n'a été mis en évidence (Abraham *et al.*, 1998). De la même façon, un essai clinique sur 969 patients ayant reçus soit un antagoniste au récepteur de l'IL-1, soit un placebo, n'a montré là encore, aucune réduction de la mortalité à 28 jours (Opal *et al.*, 1997).

A ce jour, aucune cible thérapeutique n'a pu être mise en évidence parmi ces molécules. En effet, le moment d'administration des traitements ainsi que le repérage des patients septiques peuvent être des explications pour lesquels ces essais cliniques n'ont pas pu montrer de réels bénéfices (Marshall, 2014). Certaines de ces études montrent même une augmentation de la mortalité ; l'administration d'anti-TNF- α dans un essai clinique a montré que la production des médiateurs de l'inflammation sont essentiels à une bonne réponse immunitaire (Qiu *et al.*, 2011).

L'immunosuppression étant une phase importante du sepsis, la stimulation du système immunitaire représente une bonne stratégie thérapeutique.

L'administration d'immunoglobulines (Ig) par intraveineuse n'est pas recommandée par le SSC, pourtant plusieurs raisons rendent l'utilisation des Ig intéressante (Rhodes *et al.*, 2017). D'abord, les Ig jouent un rôle d'opsonine, et participent donc à la reconnaissance du pathogène et à son élimination par les phagocytes. L'opsonisation est possible grâce à la partie variable (Fab) des Ig, capable de se lier très spécifiquement aux épitopes des pathogènes (**Figure 15**). La partie constante des Ig (Fc) se fixe ensuite aux Fc récepteurs présents à la surface des cellules immunitaires, permettant la phagocytose du complexe Ig-

pathogène par ces cellules. D'autre part, la partie Fc des Ig peut également jouer un rôle dans l'activation des PBMC et l'apoptose des cellules immunitaires, notamment des lymphocytes, qui est un évènement majeur puisqu'en partie responsable de la « paralysie » immunitaire au cours du sepsis (Esposito *et al.*, 2017; Toussaint and Gerlach, 2012).

De nombreux essais cliniques ont été réalisés pour évaluer l'efficacité des Ig dans le sepsis. Récemment, une méta-analyse a repris 18 essais cliniques entre 2009 et 2015, et a montré que l'administration d'Ig par intraveineuse, réduit la mortalité des patients septiques avec un odd ratio, c'est-à-dire un risque relatif, de 0,50 (Busani *et al.*, 2016).

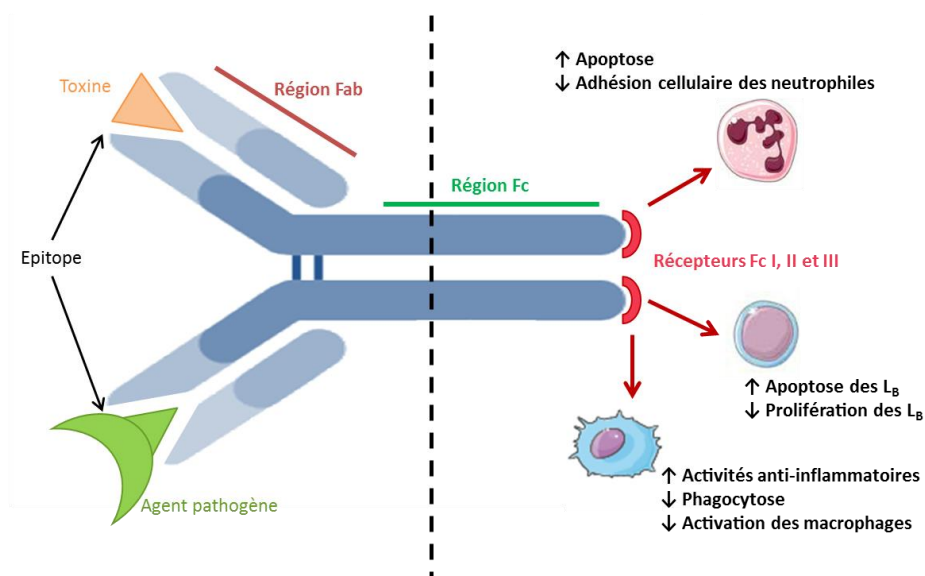


Figure 15 : Schéma simplifié représentant les différents effets possibles des immunoglobulines exercés par la partie variable Fab (à gauche) et la partie constante Fc (à droite) (modifié d'après Toussaint and Gerlach, 2012).

L'attention est aussi dirigée sur les effets à long terme du sepsis et de nombreuses thérapies ont été évaluées chez les patients survivants. Ces traitements peuvent cibler l'inflammation ou au contraire restaurer une réponse immune antimicrobienne. Ces immunostimulants sont pour la plupart des facteurs de croissance, comme le G-CSF ou le GM-CSF, des inhibiteurs de voies immunosuppressives comme l'axe PD-1 / PD-L1, ou encore des cytokines immunostimulantes telles que l'IL-7 ou l'IL-15 (Patil *et al.*, 2016).

- Les facteurs de croissance : le GM-CSF et le G-CSF sont les facteurs de croissance les plus prometteurs en tant qu'immunothérapie dans le sepsis. Ces molécules stimulent la production de neutrophiles et de monocytes par la moelle osseuse. Le GM-CSF induit en plus l'activation des monocytes et macrophages, notamment par l'augmentation de l'expression du HLA-DR. Une étude clinique dans laquelle 38 patients présentant une immunosuppression causée par un sepsis, ont été traités par GM-CSF ou placebo (Meisel *et al.*, 2009). Il a été observé une restauration de l'expression du HLA-DR des monocytes dans les 24h après administration de GM-CSF, mais aussi une réduction du temps de ventilation mécanique et du temps d'hospitalisation. Le G-CSF quant à lui, n'a pas montré au cours d'un essai clinique d'efficacité sur la mortalité (Root *et al.*, 2003). Un essai clinique est en cours, évaluant l'effet d'un traitement au G-CSF chez des patients ayant eu un choc septique associé à une cytopénie, en s'intéressant particulièrement au phénomène d'hémophagocytose (phagocytose des globules rouges et blancs par des macrophages activés) (NCT01913938).

- Les cibles de l'axe PD-1 / PD-L1 : une autre thérapie immuno-modulatoire ayant un intérêt dans le sepsis implique la voie de co-stimulation négative PD-1 / PD-L1. Des anticorps monoclonaux ciblant PD-1 ou son ligand PD-L1 pourraient rétablir l'activité des L_T dans le sepsis. Une étude a été réalisée sur un modèle de souris septiques, chez lesquelles un anti-PD-1 ou un anti-PD-L1 ont été administrés après induction d'un sepsis fongique. Une augmentation de la survie des souris traitées à l'une ou l'autre des thérapies a été observée. De plus, les $CD4^+$ et $CD8^+$ de ces souris traitées produisent de l'IFN- γ *in vitro*, confirmant la bonne restauration de l'activité des L_T (Chang *et al.*, 2013). Les mêmes essais expérimentaux ont été réalisés sur des lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ issus de patients septiques (Chang *et al.*, 2014). Ils ont montré qu'un traitement *in vitro* anti-PD-1 ou anti-PD-L1 réduisait l'apoptose des L_T et augmentait leur production d'IFN- γ et d'IL-2. Un essai clinique devrait être réalisé afin de confirmer ces résultats.

- Les cytokines immunostimulantes : une des cytokines les plus prometteuses en tant qu'immunothérapie est l'IL-7. L'IL-7 est produite par les cellules de la moelle osseuse et du thymus et est indispensable à la prolifération et la fonctionnalité des L_T . L'IL-7 protège les L_T de l'apoptose, mais augmente également leur activation et empêche leur anergie (Venet *et al.*, 2012). Cette cytokine semble donc être une candidate idéale pour lutter contre

la paralysie immunitaire du sepsis. Une étude très récente a montré que l'administration d'IL-7, chez des patients en choc septique, permet une restauration du nombre absolu de CD4⁺ et CD8⁺ circulants. Cette étude préliminaire contrôlée par placebo, permet de s'assurer de la tolérance de la molécule sur un petit nombre de patients (n= 27), et ne permet pas de conclure sur la mortalité, mais semble toutefois apporter des résultats encourageants (Francois *et al.*, 2018). L'IL-15 semble être aussi un bon agent immunostimulant. Cette cytokine est produite par les phagocytes, et induit la prolifération des CD4⁺ et CD8⁺ mémoires, et l'activation des cellules NK. Inoue *et al.*, ont montré dans un modèle murin de sepsis par ligature caecale, que l'IL-15 bloque l'apoptose des CD8⁺ et des cellules NK, améliorant ainsi la survie (Inoue *et al.*, 2010). Des essais cliniques principalement en oncologie sont en cours afin d'évaluer les effets de l'IL-15.

II.10.3. Thérapies par les phages

Les bactériophages sont des virus n'infectant que les bactéries. Des études mettent en avant le potentiel thérapeutique des bactériophages dans le sepsis. Ajoutés à leurs activités antibactériennes, les phages ont également des propriétés immuno-modulatoires (Górski *et al.*, 2017).

Les phages sont capables d'induire la production d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire qui limite les dommages tissulaires lors d'une infection. Van Belleghem *et al.* ont montré, entre autres, une augmentation de l'expression du gène de l'IL-10 par des PBMC stimulés *in vitro* avec des phages de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Van Belleghem *et al.*, 2017). Dans cette étude, ils montrent aussi que les phages sont capables d'induire l'expression du gène du récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1RA), dont l'action va être de bloquer l'expression de cytokine pro-inflammatoire et d'inhiber l'activation des cellules Th1 et des macrophages.

Les phages augmentent aussi la phagocytose des bactéries par les cellules de l'immunité. Il a été montré qu'une pré-incubation d'*E.coli* avec des phages *P.aeruginosa* T4 augmentait la capacité de phagocytose des neutrophiles (Przerwa *et al.*, 2006).

Récemment, plusieurs études sur des modèles murins de sepsis ont montré l'efficacité des phages comme traitement (Deng *et al.*, 2016; Takemura-Uchiyama *et al.*,



2014; Vinodkumar *et al.*, 2008). Dans ces études, différents phages ainsi que différents pathogènes ont été utilisés mais elles montrent toutes une amélioration clinique significative. Par ailleurs, une étude sur des patients septiques traités oralement par des phages, a montré des résultats encourageants, puisque chez 85,1% des patients, une guérison complète a été observée. (Weber-Dbrowska *et al.*, 2003).

Au vu de l'augmentation inquiétante de la résistance des bactéries aux antibiotiques, la recherche de nouvelles thérapies pour combattre l'infection est urgente. La thérapie par les phages semble constituer une bonne alternative qui associerait action antibactérienne et immuno-modulation.



Chapitre III. Le Torque Teno Virus

III.1. Introduction

Les Torque Teno Virus Humains (TTVs) sont de nouveaux agents infectieux émergents, appartenant à la famille des *Anelloviridae*. Cette famille comprend aussi certains virus infectant les animaux, par exemple les porcs (Toque Teno Sus Virus : TTsuV), les rongeurs (Rodent Torque Tenos Virus), les chiens (Torque Teno Canis Virus) (Lefkowitz *et al.*, 2018).

Le nom de Torque Teno Virus vient du latin *torques* et *tenuis*, signifiant collier et mince, respectivement, du fait de sa petite taille et à la nature circulaire de son génome. Le TTV fut découvert en 1997 par une équipe japonaise lors d'une hépatite post-transfusionnelle chez un patient négatif pour les hépatites A à G (Okamoto *et al.*, 1998). Le TTV a été isolé à partir du sérum de ce patient et sa séquence évaluée à 3739 bases. Quelques années plus en tard en 2000, au cours d'études génétiques approfondies sur le TTV, le Torque Teno Mini Virus (TTMV) fut mis en évidence (Takahashi *et al.*, 2000), suivi du Torque Teno Midi Virus (TTMDV) en 2007 (Ninomiya *et al.*, 2007). Tous sont caractérisés par une très forte prévalence ainsi qu'une répartition uniforme à travers le monde.

Actuellement, l'étude du TTV est difficile du fait de l'absence de système cellulaire adapté pour sa culture *in vitro*. Nous n'avons donc que très peu de connaissances sur le TTV et sur ses mécanismes d'action. Cependant, les résultats récents suggèrent un rôle important du TTV comme marqueur de l'état immunitaire du patient (Maggi and Bendinelli, 2009).

III.2. Structure et génome

Les TTVs sont des virus non enveloppés avec une capsid composée de 12 capsomères pentamériques (sous-unités formant la capsid) de symétrie icosaédrique.

Les TTVs ne peuvent être actuellement cultivés *in vitro* du fait du manque de système cellulaire compatible à son maintien et il n'existe à ce jour que très peu d'images des virions

des TTVs en microscopie. Les virions font en moyenne entre 30 et 50nm de diamètre excepté les virions du TTMV qui font moins de 30nm (**Figure 16**) (Itoh *et al.*, 2000).

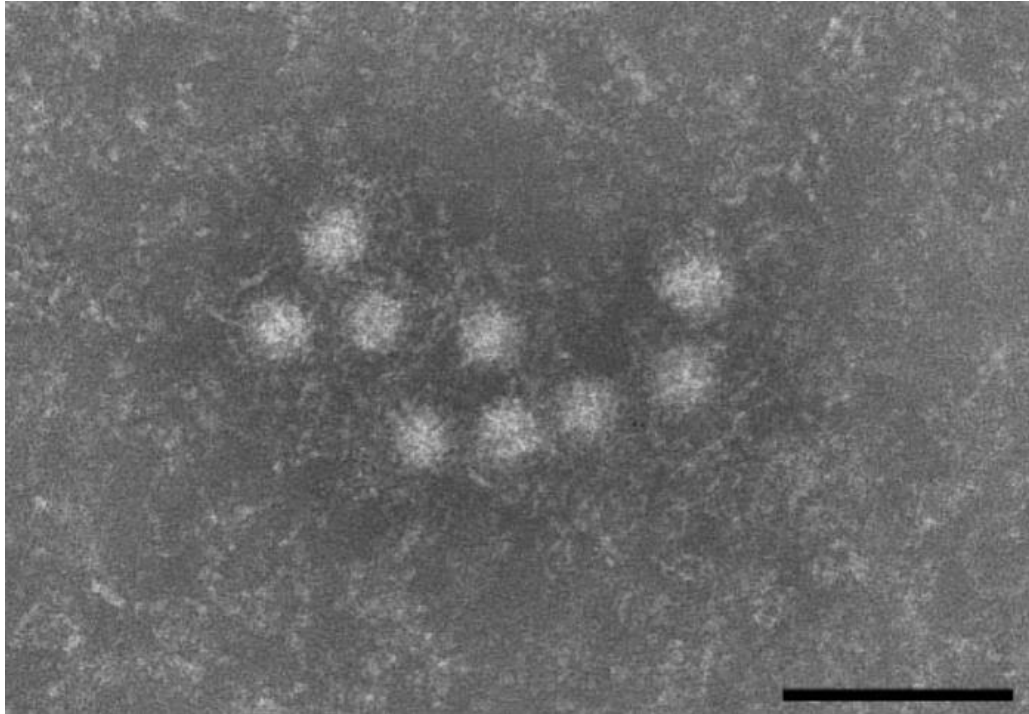


Figure 16 : Image de microscopie électronique d'un agrégat de virions de TTV d'environ 30nm de diamètre, issus de sérum de patient ayant une charge virale de 10^8 copies/mL. L'échelle en bas à droite représente 100nm (Itoh *et al.*, 2000).

A l'intérieur de la capsid se trouve le génome du TTV, consistant en un ADN simple brin circulaire à polarité négative, et avec une région riche en GC de 117 nucléotides. La taille du génome varie selon les articles, mais est estimée entre 3,6 et 3,9 kb pour le TTV, 3,24 et 3,25 kb pour le TTMDV, et enfin 2,86 et 2,91 kb pour le TTMV (Spandole *et al.*, 2015) (**Figure 17** : Schéma de l'organisation des génomes des TTVs (Biagini and De Micco, 2010) : a) Isolat du TTV : 1a, b) isolat du TTMDV : MD1-073, et c) isolat du TTMV : NLC030.).

Le génome du TTV peut être subdivisé en différentes régions : une région non codante (*UnTranslated Region* : UTR) d'environ 1,2 kb et une région codante de 2,6 kb. La première est relativement bien conservée suggérant qu'il s'agit d'une région essentielle dans la régulation de la réplication du virus.

La région codante quant à elle, comprend 2 cadres ouverts de lecture : ORF1 et ORF2 (*Open Reading Frame* 1 et 2). ORF1 code pour une protéine de structure de la capsid du virus (séquence de l'isolat TA278). ORF2 code pour une protéine possédant une activité phosphatase, impliquée dans la réplication virale et autres fonctions de régulation (Martínez-Guinó *et al.*, 2011). Récemment, une étude a suggéré que la protéine ORF2 peut être impliquée dans la régulation des réponses immunitaires innée et adaptative de l'hôte et particulièrement par la suppression de l'activité de NF- κ B (Zheng *et al.*, 2007).

D'autres cadres ouverts de lecture ont été identifiés, et les protéines en rapport, diffèrent en termes de longueur. La protéine ORF3 par exemple, est générée après épissage du gène ORF2 et partage la partie 5' de ce dernier (Okamoto *et al.*, 2000a). ORF3 code pour une protéine non structurale mais sa fonction est toujours indéterminée. Enfin, la protéine ORF4 a été identifiée dans la souche CAA82-2 du TTV, mais sa fonction ainsi que sa génération sont inconnues (Davidson and Shulman, 2008).

D'autres éléments viennent compléter le génome des TTVs, tels que des régions riches en GC d'environ 117 nucléotides chez le TTV, des TATA Box, capables d'initier la transcription, ou encore des sites poly(A) permettant de stopper la transcription.

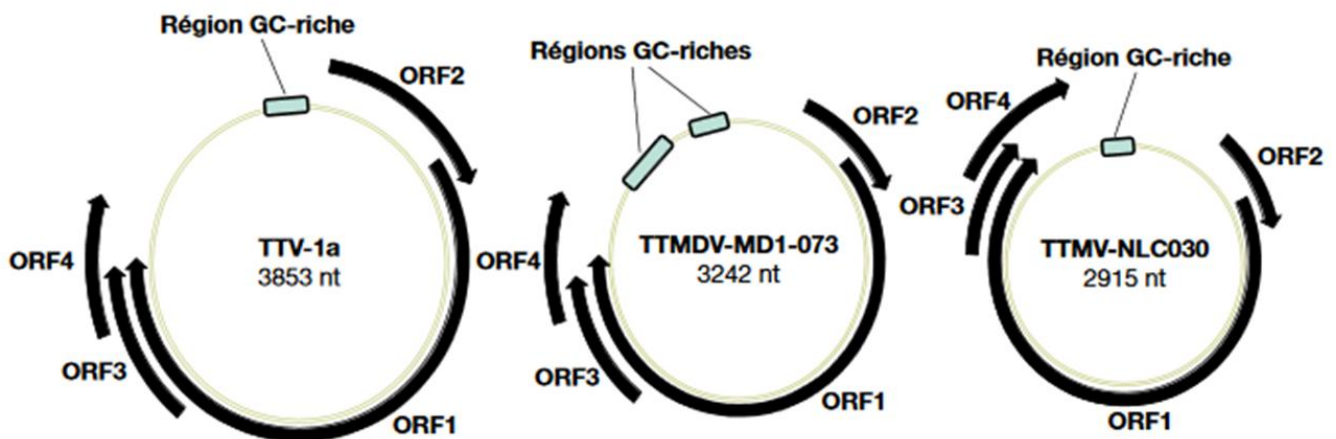


Figure 17 : Schéma de l'organisation des génomes des TTVs (Biagini and De Micco, 2010) : a) Isolat du TTV : 1a, b) isolat du TTMDV : MD1-073, et c) isolat du TTMV : NLC030.

Le mécanisme de réplication n'est pas très bien connu. Basé sur des similarités d'autres virus à ADN simple brin circulaire, le TTV semble utiliser le mécanisme de réplication circulaire de l'ADN, et utiliserait probablement l'ADN polymérase de la cellule hôte (Focosi *et al.*, 2016).

La réplication du TTV est contrôlée par le système immunitaire de l'hôte, au même titre que d'autres virus bien connus tels que l'Epstein-Barr Virus (EBV), ou le Cytomégalovirus (CMV). En effet, les patients infectés par le VIH à un stade SIDA (Syndrome de l'Immuno Déficience Acquise) ont également des titres viraux plus élevés comparés à des sujets sains (Shibayama *et al.*, 2001). Pour la première fois, il est alors énoncé l'idée que la charge virale de TTV pourrait être un bon marqueur du statut immunitaire des patients. Par ailleurs, il a été montré dans plusieurs études que les charges virales sont plus élevées chez des patients immunodéprimés après une greffe (Béland *et al.*, 2014; Focosi *et al.*, 2014; Kulifaj *et al.*, 2018). Il existe ainsi une corrélation entre l'intensité de l'immunosuppression du patient et sa charge virale de TTV.

III.3. Prévalence et Transmission

Les TTVs sont caractérisés par une importante séroprévalence supérieure à 80% ainsi qu'une distribution très uniforme à travers le monde (Focosi *et al.*, 2014). Toutefois la détection du génome des TTVs, témoignant de la réplication virale, peut varier selon la méthode de PCR utilisée et notamment selon les génotypes mis en évidence par cette technique. L'ADN du TTV est ainsi détecté dans le sérum de 53,3% de donneurs sains en Chine (Zhong *et al.*, 2001a), entre 51,6 % et 82,7% en Turquie selon les études (Erensoy *et al.*, 2002; Yazici *et al.*, 2002), et plus de 90% en Russie et Norvège (Huang *et al.*, 2001; Vasilyev *et al.*, 2009).

La mise en évidence du TTV chez des patients transfusés a permis rapidement de dire que la voie principale de transmission du TTV se fait par le sang. Par la suite, l'ADN du TTV a été retrouvé dans le mucus pharyngé et dans la salive, suggérant d'autres modes de dissémination (Chung *et al.*, 2007). Le TTV est également présent dans un grand nombre d'écosystèmes aquatiques si bien qu'une transmission orale peut être envisagée expliquant ainsi la grande prévalence du virus à travers le monde. Les TTVs ont aussi été retrouvés dans

la nourriture (viande, produits laitiers) supportant l'évidence du mode de transmission orale (Spandole-Dinu *et al.*, 2013). Enfin, une transmission par les voies sexuelles est évoquée du fait de la présence de virions dans le liquide séminal et l'épithélium cervical (Calcaterra *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2000). Cependant, il est évident que ce mode de transmission est mineur dans la dissémination des TTVs puisque l'infection survient très tôt chez l'enfant et même *in utero*. En effet, le TTMV a été détecté dans le cordon ombilical, le liquide amniotique et le sérum de nouveau-nés et ces virus possédaient des similarités avec ceux des mères (Matsubara *et al.*, 2001).

Le TTV est donc un virus très ubiquitaire, à prévalence élevée et il est très probable que l'homme s'infecte et se réinfecte au cours du temps.

III.4. Tropisme cellulaire

Du fait de l'histoire de la découverte du TTV, il a été pensé au départ que le virus était hépatotrope. En effet, des charges virales 100 fois plus élevées ont été retrouvées dans les biopsies de foie de patients ayant une hépatite chronique par rapport aux charges virales retrouvées dans le sérum de ces mêmes patients (Okamoto *et al.*, 1998). De plus, il a été montré que le virus était capable de se répliquer dans des hépatocytes à la fois *in vivo*, dans le foie de patients (Okamoto *et al.*, 2000b), et *in vitro* dans des lignées cellulaires d'hépatocytes (la lignée cellulaire Chang Liver) (Desai *et al.*, 2005).

L'ADN des TTVs a aussi été détecté dans plusieurs autres organes, cellules et fluides corporels tels que la moelle osseuse, la rate, les PBMC, la salive, les urines... (López-Alcorocho *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 1999). La présence de l'ADN du TTV dans plusieurs types d'organes et tissus a d'abord suggéré que le virus ne possède pas de tropisme cellulaire particulier.

Les cellules hématopoïétiques circulantes seraient aussi un réservoir pour le TTV puisque la présence de TTV dans les PBMC a été confirmée (López-Alcorocho *et al.*, 2000). Dans cette étude, l'ADN du TTV a été quantifié par qPCR et détecté par *Fluorescent In Situ Hybridation* (FISH), dans le cytoplasme de PBMC de patients atteints d'une maladie hépatique. Il a longtemps été pensé que les TTV n'avaient pas de tropisme cellulaire

particulier au sein des PBMC : en effet, l'ADN du TTV a été retrouvé dans les L_B, L_T, monocytes, granulocytes et cellules NK (Takahashi *et al.*, 2002).

Par ailleurs, la réplication du TTV a été mise en évidence dans une lignée cellulaire de L_B, la lignée Raji (Desai *et al.*, 2005). De plus, si l'on considère les données concernant les charges virales de TTV chez les patients immunodéprimés après une greffe, il est concevable que la réplication du virus se produise également dans les L_T (Focosi *et al.*, 2014). Une étude réalisée sur des patients atteints de leucémie (leucémie aigüe myéloïde ou leucémie aigüe lymphoblastique) semble montrer que la réplication du TTV s'effectuerait dans les lymphocytes T mais le récepteur cellulaire de ce virus n'est pas connu (Maggi *et al.*, 2010). Focosi et son équipe ont récemment montré que la virémie était grandement affectée lors de traitement ciblant les L_T, et concluent que le TTV est un virus T-lymphotropique (Focosi *et al.*, 2015).

Cependant, le manque de système cellulaire adapté pour la culture *in vitro* du TTV ou de modèle animal, laisse nos connaissances sur les mécanismes d'infection, le cycle viral et les cellules/organes cibles imparfaits.

III.5. Implication dans les pathologies humaines

Le TTV est un virus dit « orphelin » car pour le moment il n'a toujours pas été associé à une pathologie (Focosi *et al.*, 2016). Au vu de la prévalence du virus à travers le monde et de sa non-pathogénicité, le concept de virus commensal fut émis en 1999 par Griffiths. En suivant cette hypothèse, l'absence de pathogénicité pourrait être le résultat d'une longue co-évolution entre le virus et l'homme ou de l'absence de ligands cellulaires spécifiques. Des résultats récents suggèrent le TTV comme marqueur de l'état immunitaire du patient, pouvant alors être utilisé en clinique dans le but d'évaluer la compétence de l'immunité et voire même prédire les complications liées à une pathologie (Maggi and Bendinelli, 2009).

III.5.1. Pathologies hépatiques

Au moment de sa découverte, on pensait que le TTV était à l'origine un nouvel agent responsable d'hépatites (Nishizawa *et al.*, 1997), puisqu'associé à un taux élevé



d'aminotransférases (et notamment d'ALanine Amino Transférase ALAT). Une élévation du taux d'ALAT sanguin reflète principalement une hépatite virale aigüe, d'où l'hypothèse d'associer le TTV avec cette pathologie. De plus, Okamoto et son équipe a montré que chez des patients développant une hépatite post-transfusionnelle, la charge virale de TTV était jusqu'à 100 fois plus élevée dans le foie comparé au sérum (Okamoto *et al.*, 1998). Le TTV a aussi été associé à des hépatites fulminantes dans différentes études où il a notamment été montré des effets cytopathogènes du TTV dans les hépatocytes (Charlton *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000). Cependant, des données contradictoires ont été publiées par Kadayifci et son équipe, puisqu'aucune différence significative n'a été montrée lorsqu'ils ont comparé les charges virales de TTV chez des patients ayant un taux d'ALAT élevé *versus* des sujets sains (Kadayifci *et al.*, 2001). Ces résultats ne permettent donc pas d'affirmer l'implication du TTV dans les pathologies du foie.

Pour finir, il est aussi possible que certains génotypes ou espèces soient plus pathogènes que d'autres. Il a été montré dans deux études distinctes, que le génotype 1 du TTV a une implication dans l'apparition d'hépatites post-transfusionnelle (Tanaka *et al.*, 2000) et que le génotype 1a est associé principalement à des hépatites fulminantes et chroniques chez l'enfant (Okamura *et al.*, 2000).

III.5.2. Pathologies respiratoires

Le TTV est aussi capable de se multiplier dans les tissus pulmonaires (Bando *et al.*, 2001). Maggi et ses collègues ont ainsi retrouvé des charges virales de TTV importantes dans des prélèvements nasaux de patients atteints de bronchopneumonie (Maggi *et al.*, 2003). Dans une étude chez des patients atteints de fibrose pulmonaire, la charge virale de TTV est associée à la sévérité de la bronchectasie (dilatation chronique des bronches) ainsi qu'à une mortalité plus élevée (Pifferi *et al.*, 2006). Enfin, Pifferi et ses collègues ont proposé une hypothèse dans laquelle le TTV contribuerait à la pathogenèse de l'asthme puisque sa réplication dirigerait la réponse immunitaire vers la voie Th2, connue pour être impliquée dans cette maladie chronique (Pifferi *et al.*, 2005).

Il n'a cependant pas encore été clairement établi dans ces pathologies, si les infections à TTV sont la cause ou la conséquence de la progression de la maladie.



III.5.3. Cancers

L'ADN du TTV a été retrouvé dans une grande variété de tissus néoplasiques. En effet, de Villiers *et al.*, ont détecté le TTV dans 15 types de tumeurs différentes, allant du carcinome œsophagique avec 100% des patients positifs pour le TTV, mais également dans d'autres tumeurs gastriques (estomac, colon...), dans des carcinomes pulmonaires ainsi que dans des cancers non solides tels que le myélome multiple (de Villiers *et al.*, 2002). Dans cette étude, seules les biopsies ont été testées pour le TTV, et aucun tissu sain n'était disponible ; ces résultats ne permettent donc pas de conclure sur une éventuelle relation entre l'infection au TTV et la carcinogénèse. Afin de mettre en évidence l'association entre l'infection et la carcinogénèse, il faut pouvoir comparer le tissu tumoral et le tissu sain, tel que Zur Hausen l'a fait dans le cadre du Papillomavirus Humain (HPV) et le cancer du col de l'utérus (de Villiers *et al.*, 1987).

Par ailleurs, le TTV a été retrouvé avec une fréquence significativement plus élevée chez des patientes atteintes de carcinome du sein comparé à des femmes en bonne santé (Dan *et al.*, 2013). La présence d'ADN de TTV a aussi été détectée dans les PBMC de patients atteints de différents types de cancer à des taux dix fois plus élevés que chez des sujets sains (Zhong *et al.*, 2001b). Cependant, on ne sait pas si ces grandes quantités de TTV retrouvées sont une caractéristique du cancer, ou s'il s'agit d'un fait retrouvé chez les patients atteints de maladies graves en général, reflétant l'état immunologique du patient.

III.5.4. TTV et état d'immunodépression

Plusieurs études ont montré chez des patients séropositifs au VIH, une charge virale de TTV significativement plus élevée que chez des sujets sains (Fogli *et al.*, 2012; Maggi *et al.*, 2011; Shibayama *et al.*, 2001). De plus, les patients au stade SIDA de l'infection par le VIH, ont un titre viral encore plus élevé comparé à des patients séropositifs (Thom and Petrik, 2007). Dans ces études, une corrélation inverse de la charge virale de TTV et du nombre de $L_T CD4^+$ a été observée. Shibayama et son équipe ont montré que les patients ayant un nombre de $L_T CD4^+$ faible ($185/mm^3$ versus $316/mm^3$ chez les sujets contrôles) sont ceux dont la charge virale TTV est la plus élevée ($10^5-10^8/mL$ versus $10^1-10^5/mL$ chez les sujets sains) (Shibayama *et al.*, 2001).



Dans un contexte différent, il a été démontré que l'intensité de l'immunosuppression est corrélée avec la charge virale de TTV. Béland *et al.*, ont ainsi démontré que la quantité de TTV présent dans le sérum de jeunes patients transplantés était corrélée au nombre de drogues immunosuppressives prescrites (Béland *et al.*, 2014; Focosi *et al.*, 2014). Dans cette étude, les patients combinant plusieurs molécules avaient une charge virale plus élevée, comparés aux patients recevant une monothérapie. Plus l'immunosuppression est importante, plus la charge virale de TTV est élevée. La réplication du TTV se produit principalement dans les LT, il est alors logique que les immunosuppresseurs aient un impact direct sur la charge virale du virus.

Enfin, dans le cadre de greffe de CSH, il a également été montré que la charge virale de TTV est parallèle au compte lymphocytaire post-transplantation (Albert *et al.*, 2017). Dans cette étude, il a aussi été montré que la charge virale de TTV à 60 jours post-transplantation, tend à être plus élevée chez les patients développant une GvHD aigüe suite à leur greffe, comparé à ceux ne développant pas cette complication. Comprendre l'ordre de causalité permettrait d'utiliser la virémie du TTV comme marqueur pronostique, tel qu'anticiper un rejet de greffe ou une GvHD.

III.6. Immunologie et TTV

A ce jour, il n'est pas très bien compris comment le système immunitaire de l'hôte contrôle l'infection au TTV. Récemment, une étude a montré que le TTV code pour un micro ARN (miARN) capable de cibler la protéine *N-myc interactor* (ou *N-myc and STAT interactor* : NMI, facteur de transcription de la famille MYC) et STAT, induisant une diminution de la production d'IFN et une augmentation de la prolifération cellulaire (Kincaid *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que les miARN sont impliqués dans l'évasion immunitaire et donc dans la persistance du virus dans l'organisme. De plus, une étude a suggéré que la protéine ORF2 pourrait être impliquée dans la suppression de l'activité de NF- κ B et donc perturber les réponses immunitaires innée et adaptative de l'hôte (Zheng *et al.*, 2007).

On sait par ailleurs que les charges virales de TTV sont augmentées chez les patients séropositifs pour le VIH ayant atteint le stade SIDA (Fogli *et al.*, 2012; Maggi *et al.*, 2011), mais également chez des patients immunodéprimés en raison d'une greffe (De Vlamincq *et*



al., 2013; Focosi *et al.*, 2014). L'étude de Walton et son équipe montre également une augmentation de la charge virale dans le plasma de patients septiques (Walton *et al.*, 2014). De plus, il a récemment été montré un lien entre charge virale et rejet de greffe. Schiemann *et al.* ont étudié la charge virale chez 715 transplantés rénaux et ont retrouvé une corrélation inverse entre la quantité de TTV dans le sang et l'apparition d'un rejet tardif médié par anticorps (Schiemann *et al.*, 2017). De Vlaminck *et al.*, avaient, quelques années auparavant, déjà émis l'hypothèse d'une interrelation entre immunosuppression et immunocompétence dans les transplantations d'organes solides, lors d'une étude chez des patients ayant subi une greffe cœur/poumons (De Vlaminck *et al.*, 2013) (**Figure 18**).

Dans ces pathologies le suivi de la charge virale du TTV pourrait être utilisé comme marqueur du statut immunitaire des patients, la difficulté étant de déterminer un seuil de charge virale de TTV qui discriminerait un état d'immunosuppression, avec un risque d'infections opportunistes, d'un état immunitaire compétent.

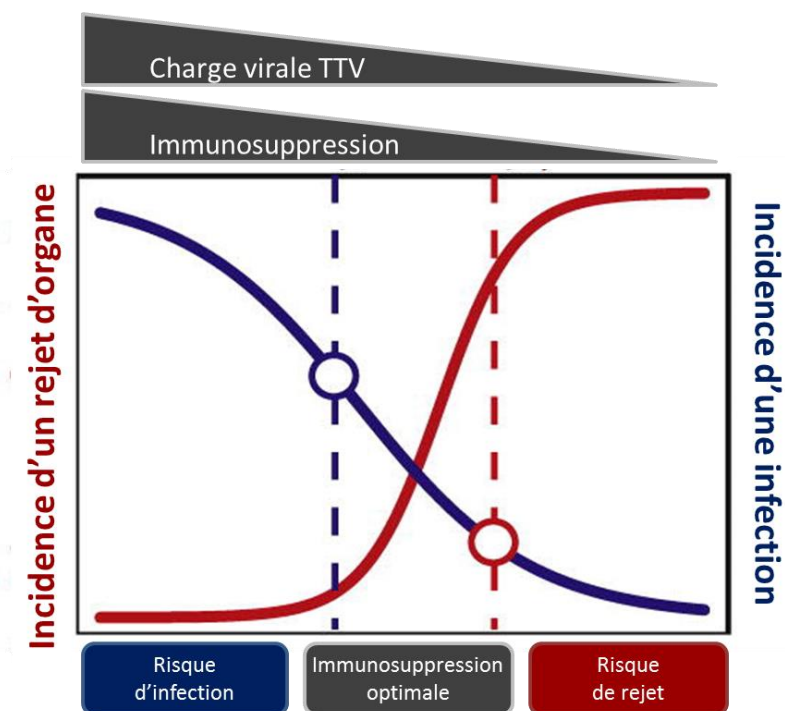


Figure 18 : Interrelation entre immunosuppression et immunocompétence dans les transplantations d'organes solides (modifié à partir de De Vlaminck *et al.*, 2013)

Objectifs

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire par le Dr Guérin et ses collègues, ont mis en évidence chez des patients atteints de sepsis, une population de granuleux immatures aux capacités immunosuppressives, et dont la fréquence dans le sang prédit la détérioration clinique du patient (Guérin *et al.*, 2014). Ces granuleux immatures, dont font parties les MDSC, ont donc un rôle majeur dans le rétablissement du patient. Une partie de notre travail a donc été vouée à l'analyse plus approfondie de cette population.

En parallèle, une étude réalisée par Walton et son équipe, a montré une réactivation de certains virus, chez des patients ayant eu un sepsis, appuyant l'état d'immunosuppression déjà observé chez ces patients (Walton *et al.*, 2014). Divers bouleversements immunologiques expliquent cet état d'immunosuppression, notamment l'apoptose d'un grand nombre de type cellulaires, mais également l'anergie des L_T (Hotchkiss *et al.*, 2013). Cependant, le rôle des MDSC dans le sepsis est encore incompris.

En agissant sur les L_T , les MDSC sont probablement responsables de leur anergie, participant donc à l'immunosuppression générale du patient septique, qui est alors sujet à des infections secondaires et réactivations virales.

Ainsi, selon cette hypothèse, mon travail de thèse a donc consisté en la caractérisation des populations de *Myeloid-Derived Suppressor Cells* (MDSC) dans le sepsis, faisant suite aux travaux du Dr Guérin *et al.*, mais également d'étudier leur rôle dans la réactivation virale au cours du sepsis, traduisant l'état d'immunosuppression du patient.

Au cours de ce projet, plusieurs points seront étudiés :

- La caractérisation du phénotype des deux sous-populations de MDSC, les M-MDSC et les PMN-MDSC par cytométrie en flux. Dans le but d'approfondir l'analyse phénotypique des MDSC, l'étude des populations myéloïdes sera également réalisée chez des patients donneurs de cellules souches hématopoïétiques, traités au G-CSF.
- La confirmation de l'origine médullaire des MDSC dans le contexte du sepsis



- Déterminer la concentration et l'évolution de la fréquence des MDSC dans le sang chez des patients septiques au cours de leur hospitalisation.

- La fréquence de ces populations présentes dans le sang sera ensuite corrélée avec le profil immunitaire des patients. Dans un premier temps, l'état inflammatoire du sepsis grâce à l'analyse du profil cytokinique des patients. Dans un second temps, l'immunosuppression par l'étude de la réactivation de certains virus, et particulièrement le Torque Teno Virus, dont le rôle de biomarqueur du statut immunitaire a déjà été soulevé dans d'autres conditions.

Ces connaissances permettront de mieux cerner la physiopathologie du sepsis et d'envisager à terme l'utilisation des MDSC comme cible thérapeutique.



Résultats

Chapitre I. Article

I.1. Introduction

Comme vu précédemment, dans de nombreuses conditions pathologiques et notamment au cours d'infections, les populations de MDSC augmentent en taille et peuvent alors être retrouvées dans le sang et d'autres compartiments (Guérin *et al.*, 2014; Mathias *et al.*, 2017). La présence de ces cellules dans le sang de patients septiques a été corrélée à des complications cliniques telles que les infections secondaires ainsi qu'à la mortalité (Uhel *et al.*, 2017). Cependant, malgré ces données, leur origine et leur place dans le sepsis sont à ce jour mal connues. Dans ce contexte nous nous sommes posé la question d'une éventuelle origine médullaire des MDSC retrouvées dans le sepsis, ainsi qu'un rôle immunosuppresseur à long terme, responsable de la réactivation de certains virus.

Pour répondre à ces questions, nous avons directement regardé la fréquence des MDSC, dans le sang et dans la moelle osseuse de patients atteints de sepsis, à différents stades de gravité (infection simple, sepsis et choc septique).

Ensuite, nous avons analysé le profil cytokinique de ces patients. Comme vu en introduction, l'orage cytokinique est un événement caractéristique du sepsis, au cours duquel la cascade d'activation de la réponse immune s'auto-amplifie résultant en la libération massive de cytokines. Nous avons donc voulu étudier *in vitro*, l'effet de ces cytokines sur les cellules de moelle osseuse.

Nous avons ainsi montré que les pourcentages de M-MDSC et PMN-MDSC sont augmentés dans le sang, que leurs fréquences sont dépendantes de la gravité de l'infection, et que leurs présences persistent au cours de l'hospitalisation. Par ailleurs, la fréquence de ces deux populations de MDSC est augmentée dans la moelle osseuse, confirmant l'hypothèse d'une origine médullaire de ces cellules.

Nous avons aussi montré que la stimulation *in vitro* de moelles osseuses saines avec des cytokines de l'orage cytokinique, résulte en l'induction de M-MDSC et de PMN-MDSC. Ces cellules ont donc une origine médullaire dans le sepsis, et sont relarguées dans le sang périphérique par la moelle osseuse, suite à l'orage cytokinique.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article scientifique ci-après, dont je suis premier auteur. J'ai réalisé l'analyse des échantillons de sang et de moelle osseuse des patients, ainsi que l'analyse de leurs profils cytokiniques. J'ai aussi effectué les stimulations *in vitro* des moelles osseuses. Enfin, j'ai réalisé les analyses statistiques pour chaque résultat présenté ainsi que l'étude de l'impact de la présence des MDSC sur la durée d'hospitalisation.

I.2. Manuscrit

Production and kinetics of Monocytic and Polymorphonuclear Myeloid Derived Suppressor Cells are different in Sepsis

Emilie Lereclus¹, Thomas Daix^{2, 3}, Thomas Lafon^{2, 3}, Alexandre Le Guyader⁴, Michael Koczerka¹, Philippe Vignon^{2, 3}, Magali Donnard¹, Sophie Alain³, Bruno François^{2, 3}, Jean Feuillard¹, Robin Jeannet^{1, 2*}

¹: UMR CNRS 7276 / INSERM 1262 and Laboratory of Hematology of the University Hospital Center of Limoges, Limoges, France

²: Clinical Investigation Center of the University Hospital Center of Limoges, Limoges, France

³: INSERM 1092 and University Hospital Center of Limoges, Limoges, France

⁴: Thoracic and Cardiovascular Surgery and Angiology, University Hospital Center of Limoges, Limoges, France

Corresponding author. Dr Robin Jeannet, UMR CNRS 7276 / INSERM 1262 and Clinical Investigation Center of the University Hospital Center of Limoges, Centre de Biologie et de Recherche en Santé, Avenue Bernard Descottes, 87042 Limoges, France. Email: robin.jeannet@unilim.fr.

Key words: Sepsis, Myeloid Derived Suppressor cells.

Abstract

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) can be subdivided into polymorphonuclear (PMN-MDSC) and a monocytic (M-MDSC) subsets. During sepsis, MDSCs play a role in immunosuppression phase. But it remains unclear how they are produced and recruited and what is their kinetics during the sepsis course.

Fifty seven infected patients were enrolled and classified according to clinical severity. Levels of M and PMN-MDSCs were monitored by flow cytometry in peripheral blood at Day (D) 0, D3, D7 and D14 concomitantly to cytokines dosages. Twenty bone marrow (BM) samples from patients with thrombocytopenia at diagnosis and seven normal BM samples were studied.

Compared to healthy controls, both M and PMN-MDSC BM levels were increased at initial diagnosis of sepsis. BM production of M and PMN-MDSCs was increased after *in vitro* treatment with G-CSF and IL-6 respectively. Plasma G-CSF and M-MDSC circulating levels were increased at the initial phase of the sepsis without relationship neither with clinical severity nor with monocyte levels. Those of IL-6 and circulating PMN-MDSC were mainly increased in patients with septic shock, remained high during their hospitalization and paralleled increase of immature granulocytes. Initial increase of circulating PMN-MDSC was associated with prolonged hospitalization.

Altogether, these results suggest that both M and PMN-MDSCs are very likely to clinically reflect the suppressive immune phase of sepsis, being produced in the bone marrow at the very beginning of infection, and persisting in case of prolonged hospitalization whatever the sepsis severity for M-MDSCs and in case of septic shock for PMN-MDSCs.





Introduction

In industrial countries, sepsis remains a frequent pathology and is a leading cause of death. It has recently been acknowledged as a worldwide issue through a World Health Organization resolution (Reinhart et al., 2017). Despite care improvement, 25–30% of patients with sepsis die from the condition, with hospital mortality for septic shock approaching 40–60% (Cecconi et al., 2018; Vincent et al., 2014). Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by dysregulated host response to bacterial infection (Singer et al., 2016). It happens when the innate immune system fails to prevent or resolve infection triggered by a pathogen which results in a failure to return to normal homeostasis (Hotchkiss et al., 2013). In sepsis, the immune response is deregulated in two opposite directions: hyper-inflammation and immune suppression.

Hyper-inflammation is due to a marked systemic inflammatory response triggered by the release of cytokines (pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-6, INF- γ , IL-1 β ...), chemokines (e.g., IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , eotaxin, IP-10), growth factors (e.g., VEGF, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF), other interleukins (e.g., IL-9, IL-15 and IL-17), in conjunction with the activation of the complement complex and of the coagulation process. Cells of the innate immune response, mainly neutrophils and monocytes, play a major role in the inflammatory response. This cellular activation can be self-amplified and may lead to an uncontrolled positive amplification loop which ultimately results in multi-organ failure (Van der Poll and Opal, 2008). Various studies suggested that the severity of the sepsis may be related to the inability of the host to adjust its immune system against the pathogen (Hotchkiss and Nicholson, 2006). Such adjustments correspond to mechanisms devoted to down regulation of the inflammatory and immune response. These mechanisms include secretion of the immune suppressive cytokine interleukin-10 (IL-10) (Ward et al., 2008), lymphocyte



induced exhaustion and/or apoptosis (Hotchkiss et al., 1999b), the latter being responsible for global lymphopenia (Drewry et al., 2014) and expansion of cells that actively down-regulate the immune response, among them the Myeloid Derived Suppressive Cells (MDSC), that can be evidenced in peripheral blood of septic patients and may be involved in delayed recovery (Daix et al., 2018 ; Guérin et al., 2014 ; Mathias et al., 2017 ; Uhel et al., 2017).

MDSCs are found in a large array of pathologies from cancer to obesity (Veglia et al., 2018). MDSCs are thought to be a major cause of local immune suppression allowing the tumor escape from the host immune surveillance in breast cancer; non-small-cell lung cancer; colon and colorectal cancers for example (Veglia et al., 2018). Increased levels of circulating MDSCs is associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphomas (Azzaoui et al., 2016). Two main subtypes of MDSCs have been reported, those derived from monocytes (M-MDSCs) and those from polymorphonuclear granulocytes (PMN-MDSCs). As reported (Bronte et al., 2016), M-MDSCs are phenotypically characterized by the loss of HLA-DR molecule at the surface of CD14 positive monocytes. PMN-MDSCs are supposed to belong to the CD33 positive CD11b weak immature granulocyte compartment, with low expression of CD16 and CD15. Beside these two main subtypes, early stage MDSCs (e-MDS) have also been reported in cancers, being CD33^{high} when compared to PMN-MDCs. Whatever the phenotypic characterization, MDSCs are functionally defined by their capabilities to block T-cell responses. Among inhibitory tools of MDSC is the expression of the arginase enzyme, which effect is to deprive the microenvironment from arginine. This arginine privation is responsible for T-cell global inhibition (Gabrilovich et al., 2012). Another inhibitory tool of MDSCs is expression of PD-L1. MDSCs have emerged as a universal regulator of immune function in many pathologic conditions, even if their role in infectious diseases and sepsis remain unclear (Ost et al., 2016; Veglia et al., 2018). Few publications specifically report on MDSCs in sepsis. We previously showed that patients with septic shock exhibit a subset of



circulating MDSCs able to kill their cognate T-cell (Guérin et al., 2014). In sepsis secondary to surgery, the presence of MDSCs is linked to chronic infection (Mathias et al., 2017). Expansion of PMN-MDSCs was found to be associated with enhanced susceptibility to nosocomial infections when septic patients were hospitalized in intensive care units (ICU) (Uhel et al., 2017). Because exaggerated immune suppression is a source of secondary complications, among them nosocomial infections or viral reactivation (Hotchkiss et al., 2016), immune restoration therapies have been also proposed in sepsis (Daix et al., 2018). In cancers, therapies specifically targeting MDSCs have been proven to delay tumor initiation and to prolong survival in tumor bearing mice (Gabrilovich et al., 2012). But, MDSC heterogeneity is one of the main factors limiting their targeting for immune therapies.

In the view to better understand mechanism of immune suppression of sepsis, it is certainly important to dissect the respective place of M and PMN-MDSCs during the patient course. Our objectives were to determine whether M-and PMN MDSCs may have a bone marrow origin in sepsis and how these two MDSC subtypes evolve in peripheral blood during sepsis according to severity of the disease as well as to the cytokine profile and the clinical course of patients. Furthermore, PD-L1 expression was studied in a systematic manner.

Materiel and methods

Patients and control

We designed a prospective monocentric observational study, accepted by the Ethics Committee of Limoges University Hospital. Written information was given to the patients or patient's legally authorized representative. The trial was registered in ClinicalTrial.gov: NCT02903082. Patients admitted in Intensive Care Unit or Emergency Department with an



acute infection (evolving for less than 24 hours) were eligible. Patients were divided into three groups based on Sepsis – 3 definition (Singer et al., 2016) : (i) infection, (ii) sepsis, (iii) septic shock. Exclusion criteria were pregnancy, HIV infection, cancer, inflammatory or hematological disease, immunosuppressive treatment and previous sepsis during last month. Demographics data, site of infection, microbiological documentation, hospital and ICU stays were recorded. During hospital stays we notified the days of the flow cytometry analysis (Day-0 and as closed as possible of Day-3, Day-7 and once a week), SOFA score, catecholamine infusion, mechanical ventilation if needed and lactate level if available. Occurrence of secondary infections during hospitalization was adjudicated by independent expert. For patients hospitalized in ICU with low platelets count ($<100.000/ \text{ml}$) or a greater than 50% decreased in the last 48 hours related to sepsis a myelogram was done. For blood analysis control, we recruited outpatients (n= 13) at the time of anesthesia evaluation prior to a minor planned surgery without any hematological or infectious disorders. Bone marrow control was obtained from patient undergoing cardiac surgery when a sternotomy was required.

Flow cytometry

Flow cytometry analysis was performed on leftovers of complete blood count at the time of enrollment, and nearly as closed as possible of Day-3, Day-7 and Day-14. After red blood cell lysis, samples were incubated at room temperature with the following antibodies: HLA-DR-PE (clone L243), CD14-PE-CF594 (clone M ϕ P9), CD33-PE-Cy7 (clone P67.6), CD11b-APC-Cy7 (clone ICRF44), CD16-V421 (clone 3G8) and CD45-AmCyan (clone 2D1), all from BD Biosciences and PD-L1-APC (clone 29E.2A3) from BioLegend. The Lin-FITC cocktail was composed of the following antibodies: CD3 (clones UCHT1), CD19 (HIB19), CD20 (2H7), CD56 (HCD56) and CD123 (6H6). Lysis of red blood cells was

performed with RBC Lysis Buffer (BioLegend) or VersaLyse (Beckman Coulter). Acquisitions were made using a Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter) and analysis was done using Kaluza Software (Beckman Coulter). Gating strategy of the different populations is defined in Supplementary Figure 1.

Cell isolation and sorting

Fresh PBMCs were obtained from healthy donors after Ficoll density centrifugation. The CD3⁺ T cells were separated from the PBMCs using an EasySep Human T Cells Isolation Kit (Miltenyi Biotech), according to the manufacturer's protocol. Purity of the CD3⁺ T cells after depletion was >93% and viability was checked by Trypan blue dye. MDSC from patients were sorted using an ARIA II (FACS Aria, BD Biosciences) as Lin⁻ CD11b⁺ CD33⁺ CD14⁺ (Monocytes subset) Lin⁻ CD11b⁺ CD33^{dim} CD14⁻ CD16⁻ (Immature granulocytes).

Functional assay

Purified cells were labeled with VPD450 (BD Biosciences), and co-cultured with MDSC in 48-well round bottom plates with enriched RPMI, at different ratio (2:1 and 0.5:1). Cells were stimulated or not with a cocktail of beads coated with anti-CD2, anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (2,5x10⁶ beads per 5x10⁶ T cells) from T Cell Activation/Expansion Kit according to the manufacturer's instructions (StemCell). After 4 days, cells were labelled with anti-CD3-PerCpCy5.5 and anti-CD247-FITC (CD3 ζ) (BioLegend), and Violet Proliferation Dye 450 (VPD450, BD Biosciences) dilution was assessed by flow cytometry.



Bone marrow culture

Remaining normal bone marrow samples were acquired from thoracic surgery on patients having no known haematological pathologies according to procedures of the labeled Biological Resources Center of the Hospital University Center of Limoges. Bone Marrow aspirates were filtrated with 35µm nylon mesh (Falcon, Fisher Scientific) to eliminate aggregates. Cells were washed with PBS and plated (1×10^6 cells / well) into a 24-well culture plate in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco) supplemented with 10% FBS, 25mM HEPES, 1% penicillin / streptomycin, 1% glutamine and 10µM β -mercaptoethanol (Marigo et al., 2010). Cells were cultured with 40ng/mL of G-CSF, GM-CSF, IL-6, or their combinations, except for control condition. After 4 days at 37°C, 5% CO₂ of incubation, cells were analyzed by flow cytometry for MDSC staining.

Cytokines measurements

Plasma samples were stored at -80°C until use. Plasma levels of IL-6, IL-8, IL-10 and G-CSF, were determined by Cytometric Beads Array method (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Cytokine plasma levels acquisition were performed in a FACS Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analysis were performed with the FlowJo software.

Statistical analysis

Student's T tests were used, and $p < 0.05$ was considered significant. GraphPad Prism6 was used as software. Cumulative incidence curves between length hospital stay and MDSC levels



were performed with R using the Survival package (T. M. Therneau and P. M. Grambsch, 2000).

Results

Patient Characteristics

Fifty-seven patients were enrolled from either emergency department (26 patients) or intensive care unit (31 patients). Patients were separated in three groups, infection (n=16, 28%) sepsis (n= 21, 37%), septic shock (n=20, 35%). Main characteristics are presented in Table 1. Four patients (7%) died before Day-30. Sites of infections were intra-abdominal (n = 16, 28%), urinary tract (n = 12, 21%) and bronchopulmonary infection (n=9, 16%). Infections were microbiologically documented for 38 patients (67%). Lymphopenia below 1.5 G/L was found in 12 (75%), 17 (81%) and 15 (75%) patients with infection, sepsis and septic shock respectively (p= 0.9831). 0 (0%), 7 (33%) and 11 (55%) patients with infection, sepsis and septic shock respectively exhibited a thrombocytopenia below 100 G/L (p= 0,0259).

Flow cytometry characterization of M and PMN-MDCs.

To see whether persistent infection could be associated with increase in circulating MDSCs subsets we designed an immunostaining and a gating strategy based on the panel of markers recommended by Bronte et al. (Bronte et al., 2016). The only one difference was the replacement of CD15 by CD16 marker for mature granulocytes. The gating strategy is presented in Supplementary Figure 1. Briefly, CD45^{pos} Lin⁺ CD33^{neg} lymphocytes were excluded, M-MDSCs were CD16^{neg}, CD33^{high}, CD14^{pos}, HLA-DR^{neg} and PMN-MDSCs were Lin⁻, CD11b^{pos}, CD33^{dim}, CD16^{neg/low}, HLA-DR^{neg}. This gating strategy allowed identification of functional MDSCs, since, when isolated by FACS and co-incubated with T-cells *in vitro*,

they induced a T-cell decreased expression of the CD3 ζ subunit of the TCR complex, an effect known to be related to T-cell inactivation by the arginase 1 enzyme, one of the functional characteristics of MDSCs (Supplementary Figure 2).

Bone marrow levels of M and PMN MDSCs are increased in septic patients at admission in ICU.

In a first step, we raised the question of the MDSC bone marrow content. As shown in Figure 1A and 1B, M-MDSCs were almost absent from control bone marrow samples while PMN-MDSCs were detectable at low level, always below 5% of bone marrow CD45⁺ leucocytes. Percentages of M-MDSCs were increased in 16/20 patients (80%), with a roughly comparable distribution of percentages for patients with sepsis (black squares) and septic shock (black triangles). Compared to bone marrow controls, this suggests that M-MDSCs were de novo produced. Of note, bone marrow levels of M-MDSCs remained constantly below 5% of total bone marrow CD45⁺ cells. Bone marrow levels of PMN-MDSCs were increased in 12/20 (60%) infected patients, ranging 5% to 18% of CD45⁺ leucocytes, again with absence of clear relationship with the clinical severity, as illustrated by the dispersion of the values for patients with sepsis or septic shock. Compared to controls, this also indicates an increase of PMN-MDSC production in bone marrow patients. Altogether, both M and PMN-MDSCs were likely to be produced in the bone marrow of patients at the initial phase of sepsis.



Production of M and PMN-MDSCs from bone marrow cells are differently regulated by G-CSF and IL-6

In a next step, we search to know whether cytokines known to play a role in MDSC production such as G-CSF or IL-6 differently regulate M and PMN-MDSC production (Marigo et al., 2010). Whole bone marrow cells from control patients were *in vitro* incubated with or without cytokines for four days. In absence of any cytokines, spontaneous but heterogeneous increase of both M and PMN-MDSCs was found. This spontaneous increase was moderate, did not reach statistical significance for M-MDSC, and was more pronounced for PMN-MDSCs (Figure 2A and 2B). G-CSF induced an increase of M-MDSC production from bone marrow cells (Figure 2A and 2C). By contrast, G-CSF tended to repress spontaneous expansion of PMN-MDSCs, and only IL-6 tended to homogeneously increase their production in all but one bone marrow sample (Figure 2B and Figure 2D, paired t-test = 0.0279). These results indicate that production of M and PMN-MDSCs were differently regulated, the former being *in vitro* sensitive to presence of G-CSF and the latter to IL-6.

G-CSF and IL-6 plasma levels are increased together with IL-8 and IL10.

We then assessed the levels of G-CSF and IL-6 in plasma of patients together with IL-8, one of the cytokine of the sepsis cytokine storm (Bozza et al., 2007), known to be a chemoattractant for mature granulocytes (Russo et al., 2014) and IL-10, a cytokine reflecting the immunosuppression phase of sepsis (Oberholzer et al., 2002). As shown in Figure 3, plasma levels of these four cytokines were increased in patients at Day-0, whatever the clinical severity. Being increased at Day-0 in most patients, levels of G-CSF tended to be stable during hospitalization (Figure 3A). IL-6 levels were increased in most patients at Day-0 and remained high at Day-3 and Day-7 in patients with septic shock and slowly decreased in

septic patients with prolonged hospitalization (Figure 3B). Levels of IL-8 were closed to controls at Day-3 and Day-7 in patients with infection and sepsis and remained increased in patients with septic shock (Figure 3C). kinetics of IL-6 and IL-8 levels suggest that the inflammatory phase was rapidly resolved in the less severe patients but was prolonged in case of septic shock. Levels of IL-10 were increased mainly in patients with either sepsis or septic shock at Day-0 and were rapidly normalized in patients with infection while remaining moderately increased in sepsis and septic shock patients, in agreement with known delayed immunosuppression phase of sepsis (Figure 3D). Altogether, these results indicate that kinetics of G-CSF and IL-6 production differed, levels of the former remaining increased and being independent of clinical severity and levels of the latter remaining increased in septic shock patients with prolonged hospitalization, a characteristic also found for IL-8 and IL-10.

Kinetics of M and PMN MDSCs are different during sepsis.

After the assessment of cytokine levels, we monitored peripheral blood levels of total Monocytes, M-MDSCs, total granulocytes, immature granulocytes and PMN-MDSCs during sepsis. At Day-0, circulating levels of M-MDSCs were significantly increased with disregards to clinical severity of infected patients (Figure 4A). When compared to controls, such increase was persistent in patients with prolonged hospitalization (Figure 4A: Day 3, 7 and 14). Monocytes levels remain stable over time with only a small decreased in septic shock patients at Day 0 (Supplementary Figure 3A). Thus, presence of circulating M-MDSCs in sepsis was not related to over production of monocytes. PMN-MDSCs were significantly increased at Day-0 only in patients with septic shock (Figure 4B). Then, levels of PMN-MDSCs tended to increase continuously until Day-7 in these patients (Figure 4B: Day 3 and 7). While levels of total mature granulocytes were increased in peripheral blood of all patients, remaining high

during prolonged hospitalization (supplementary figure 3B and 3C), kinetics of immature granulocytes paralleled the one of PMN-MDSCs, being significantly increased in septic shock patients only at Day-0, and remaining high during their prolonged hospitalization (Supplementary Figure 3D). This suggests that increase of circulating PMN-MDSC is part of the broad increase of immature granulocyte during septic shock.

Altogether, our results indicate that kinetics of M and PMN-MDSCs expansion during sepsis were different and that only PMN-MDSCs levels were influenced by the initial clinical severity.

PD-L1 expression was increased on PMN-MDSCs from patients with sepsis and septic shock.

To further investigate the putative immunosuppressive capabilities of M and PMN-MDSCs, we looked at PD-L1 expression. As shown in Figure 5A and 5B, PD-L1 was hardly or not expressed by M and PMN-MDSCs from controls. PD-L1 was neither expressed on M-MDSCs from infected and septic patients. By contrast, at Day-0, PD-L1 expression levels were significantly expressed on PMN-MDCs from patients with sepsis and were even higher for septic shock patients. At Day-3, PD-L1 expression levels return to those of control (Figure 5B). This suggests that PD-L1 expression was transiently induced only on PMN-MDSCs at the initial phase of sepsis. Interestingly, PD-L1 expression was also found on immature and mature granulocytes from septic shock patients (Supplementary Figure 4), that suggests its expression was globally induced on the myeloid compartment. Then, effect of G-CSF and IL-6 was assessed on normal bone marrows. PD-L1 expression was not induced on bone marrow M-MDSCs after cytokine treatment (Figure 5C). By contrast, G-CSF tended to increase levels of PD-L1 expression on PMN-MDSC in all but one case (Figure 5D and Supplementary



Figure 5). Thus, despite its repressive effect on PMN-MDCs bone marrow production, G-CSF was able to induce PD-L1 expression on these cells as well as on the other myeloid cell subsets.

High levels of peripheral blood PMN-MDSCs are associated with prolonged hospitalization.

Finally, we looked whether increased levels of M or PMN-MDSCs in blood were associated with care duration. As show in Figure 6A, no relationship was evidenced between levels of M-MDSCs and duration of patient hospitalization (logrank test, $p=0,421$). Results presented in Figure 6B suggests that high percentages of circulating PMN-MDSCs at Day-0 were associated with prolonged hospitalization (logrank test, $p = 0,029$). This was particularly true for the first 2 weeks for which the 95% confidence interval of patients with PMN-MDSCs percentages above the third quartile hardly overlaps with the confidence interval of the other patients.



DISCUSSION

In this study, we raised the question of the bone marrow production of M and PMN-MDSCs and of their kinetics in hospitalized infected or septic patients. It is shown that both M and PMN-MDSCs were present in the bone marrow at the initial phase of sepsis and that their production was induced by G-CSF and IL-6 respectively. In peripheral blood, M-MDSCs were increased over all duration of hospitalization whatever the clinical severity while PMN-MDSCs were mainly increased patients with septic shock.

From a flow cytometry point of view, it is often admitted that immunophenotypic characterization of MDSCs should be completed by functional studies (Bronte et al., 2016). Here, we used a panel of markers that has been consensually recognized as informative to specifically gate M and PMN-MDSCs (Bronte et al., 2016). Nevertheless, it was important to check that this gating strategy encompass cells with immunosuppressive activity. One of the main immunosuppressive way for MDSCs is production of arginase 1 enzyme, an enzyme that inhibits T-cell activation by depleting the medium from arginine (Rodríguez and Ochoa, 2008). Arginine depletion results in down-regulation of the CD3 ζ subunit which in turns decreased signaling capabilities of the TCR (Rodriguez et al., 2002). For technical reasons, mainly due to lack of samples with enough total white blood cells, yield of MDSC purification from infected or septic patients were too low to allow further functional studies. Thus, we applied this gating strategy to hematopoietic stem cell (HSC) donors samples who received G-CSF before leukapheresis, since increased levels of MDSCs have been reported in these cases (Luyckx et al., 2012). As expected, addition of both M and PMN-MDSCs down-regulated expression of the CD3 ζ subunit after 4 days of co-culture with primary T-cells. Of



course, it cannot be excluded that MDSCs from septic patients and healthy HSC donor could be different. But it suggests that our gating strategy allow to isolate functional MDSCs.

It has been already shown that both M and PMN-MDSCs originate from the bone marrow in mouse models of sepsis, (Brudecki et al., 2012; Delano et al., 2007; Sander et al., 2010). In human, ex vivo culture of normal bone marrow samples revealed a spontaneous increase in production of both M and PMN-MDSCs, which suggests that engagement in MDSC differentiation pathway could be repressed in healthy individuals. Such inhibition would prevent inadequate immune suppression effect of MDSCs. Marigo et al show that IL-6 and G-CSF increase bone marrow production of MDSCs in mice, but without differentiating M and PMN-MDSCs (Marigo et al., 2010). Here, levels of both cytokines were increased at the initial phase of infection. These two cytokines of the sepsis cytokine storm, acted differently on human M and PMN-MDSCs bone marrow production since G-CSF promoted M-MDSC expansion while IL-6 increased bone marrow levels of PMN-MDSCs cells. This is in agreement with the fact that the inflammatory phase of sepsis induced its own down regulation (Munford and Pugin, 2001) through, here, increase of bone marrow MDSC production.

For ethical reasons, sepsis bone samples were issued from patient in the frame of thrombocytopenia exploration. Since thrombocytopenia is a biological marker of sepsis severity, patients with infection or mild sepsis were missed. Both M and PMN-MDSCs were present in the bone marrow of most patients with sepsis or septic shock at Day-0. This indicates that the immunosuppressive phase of sepsis was already installed at the very beginning of infection for these patients. In that view, it is interesting to note increase of IL-



10 plasma levels at Day-0 of infection was found mainly for patients with sepsis or septic shock. In the meantime, IL-6 and IL-8 inflammatory cytokines were also increased in the same patients. As reviewed recently, this is the clear illustration that, in septic patients, both inflammatory and immune suppressive phases are installed very early after beginning of infection (Hotchkiss et al., 2016).

From our results, M-MDSCs were almost absent from normal bone marrow samples and were found in both bone marrow and peripheral blood of infected patients. Kinetics of both G-CSF and M-MDSCs circulating levels were parallel, being increased at Day-0 in infected patients and remaining above normal levels during hospitalization whatever the clinical severity. This suggests a continuous bone marrow production of these cells. The fact that monocyte percentages were not increased raises the hypothesis that M-MDSC production would result from a specific engagement of bone precursors in this differentiation pathway. Accordingly, it has been shown that the mTOR pathway is essential for the bone marrow differentiation and immunosuppressive function of M-MDSCs in a mouse allograft model (Wu et al., 2016).

PMN-MDSCs could be detected at low levels in normal bone marrow samples and their bone marrow production was increased after IL-6 stimulation. Kinetics of both plasma IL-6 and circulating PMN-MDSCs levels were parallel, being mainly increased in patients with septic shock and remaining high in these patients when hospitalization was prolonged. These kinetics were closed from the one of circulating immature granulocytes. During sepsis, inflammatory cytokines such as IL-6, G-CSF and GM-CSF are known to increase granulopoiesis and to accelerate bone marrow release of myeloid precursors, so called, emergency myelopoiesis (Loftus et al., 2018). Levels of circulating immature granulocytes is



predictive of the sepsis severity (Daix et al., 2018; Guérin et al., 2014). In sepsis, circulating immature granulocytes compartment encompass cells with MDSC activity (Guérin et al., 2014). In agreement with these features, we found high levels of circulating PMN-MDSCs were markedly associated with prolonged hospitalization. Thus, contrasting with M-MDSC increase, it is very likely that increase of circulating PMN-MDSCs is the result of a global increase of myelopoiesis with accelerated release of myeloid precursors rather than a specific engagement of a bone marrow precursor into PMN-MDSC differentiation.

PD-L1 has been thought to be a possible maker for MDSCs in sepsis (Huang et al., 2014b; Wang et al., 2015) and could be a potential therapeutic target of interest (Patera et al., 2016; Shindo et al., 2017). In our study, even if these cells were likely to have T-cell inhibitory properties, we did not find over expression of PD-L1 on M-MDSC, that suggests the absence of PD-1/PD-L1 axis involvement for these cells. PD-L1 expression on PMN-MDSC was associated with severity at Day-0. The fact that PD-L1 expression was inducible by G-CSF and was increased not only on PMN-MDSCs but also on immature and mature granulocytes suggest that under G-CSF, a major cytokine in myelopoiesis increase, the whole granulocytic compartment could exhibit some immunoregulatory properties.

Altogether, our results clearly suggest that both M and PMN-MDSCs reflect the immuno-suppression phase of sepsis. Because M and PMN-MDSCs are differently regulated, M-MDSC being specifically induced and PMN-MDSCs participating to the global increase of myelopoiesis with expression of PD-L1, these results open new perspectives on their specific immuno-suppressive roles during sepsis.



REFERENCES

- Azzaoui, I., Uhel, F., Rossille, D., Pangault, C., Dulong, J., Le Priol, J., Lamy, T., Houot, R., Le Gouill, S., Cartron, G., et al. (2016). T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood* *128*, 1081–1092.
- Bozza, F.A., Salluh, J.I., Japiassu, A.M., Soares, M., Assis, E.F., Gomes, R.N., Bozza, M.T., Castro-Faria-Neto, H.C., and Bozza, P.T. (2007). Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit. Care* *11*, R49.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* *7*, 12150.
- Brudecki, L., Ferguson, D.A., McCall, C.E., and El Gazzar, M. (2012). Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect. Immun.* *80*, 2026–2034.
- Cecconi, M., Evans, L., Levy, M., and Rhodes, A. (2018). Sepsis and septic shock. *Lancet Lond. Engl.* *392*, 75–87.
- Daix, T., Guerin, E., Tavernier, E., Mercier, E., Gissot, V., Héroult, O., Mira, J.-P., Dumas, F., Chapuis, N., Guitton, C., et al. (2018). Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest*.
- Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K.M., O'Malley, K.A., Wynn, J.L., Antonenko, S., Al-Quran, S.Z., et al. (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J. Exp. Med.* *204*, 1463–1474.
- Drewry, A.M., Samra, N., Skrupky, L.P., Fuller, B.M., Compton, S.M., and Hotchkiss, R.S. (2014). Persistent Lymphopenia after Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality. *Shock* *42*, 383–391.
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 253–268.
- Guérin, E., Orabona, M., Raquil, M.-A., Giraudeau, B., Bellier, R., Gibot, S., Béné, M.-C., Lacombe, F., Droin, N., Solary, E., et al. (2014). Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit. Care Med.* *42*, 2007–2018.
- Hotchkiss, R.S., Swanson, P.E., Freeman, B.D., Tinsley, K.W., Cobb, J.P., Matuschak, G.M., Buchman, T.G., and Karl, I.E. (1999). Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* *27*, 1230–1251.
- Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 862–874.



Hotchkiss, R.S., Moldawer, L.L., Opal, S.M., Reinhart, K., Turnbull, I.R., and Vincent, J.-L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16045.

Huang, X., Chen, Y., Chung, C.-S., Yuan, Z., Monaghan, S.F., Wang, F., and Ayala, A. (2014). Identification of B7-H1 as a novel mediator of the innate immune/proinflammatory response as well as a possible myeloid cell prognostic biomarker in sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 1091–1099.

Loftus, T.J., Mohr, A.M., and Moldawer, L.L. (2018). Dysregulated myelopoiesis and hematopoietic function following acute physiologic insult. *Curr. Opin. Hematol.* 25, 37–43.

Luyckx, A., Schouppe, E., Rutgeerts, O., Lenaerts, C., Fevery, S., Devos, T., Dierickx, D., Waer, M., Van Ginderachter, J.A., and Billiau, A.D. (2012). G-CSF stem cell mobilization in human donors induces polymorphonuclear and mononuclear myeloid-derived suppressor cells. *Clin. Immunol.* 143, 83–87.

Marigo, I., Bosio, E., Solito, S., Mesa, C., Fernandez, A., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Biccato, S., Falisi, E., et al. (2010). Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* 32, 790–802.

Mathias, B., Delmas, A.L., Ozrazgat-Baslanti, T., Vanzant, E.L., Szpila, B.E., Mohr, A.M., Moore, F.A., Brakenridge, S.C., Brumback, B.A., Moldawer, L.L., et al. (2017). Human Myeloid-derived Suppressor Cells are Associated With Chronic Immune Suppression After Severe Sepsis/Septic Shock. *Ann. Surg.* 265, 827–834.

Munford, R.S., and Pugin, J. (2001). Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 316–321.

Oberholzer, A., Oberholzer, C., and Moldawer, L.L. (2002). Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit. Care Med.* 30, S58-63.

Ost, M., Singh, A., Peschel, A., Mehling, R., Rieber, N., and Hartl, D. (2016). Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6.

Patera, A.C., Drewry, A.M., Chang, K., Beiter, E.R., Osborne, D., and Hotchkiss, R.S. (2016). 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.

Reinhart, K., Daniels, R., Kissoon, N., Machado, F.R., Schachter, R.D., and Finfer, S. (2017). Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N. Engl. J. Med.* 377, 414–417.

Rodríguez, P.C., and Ochoa, A.C. (2008). Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* 222, 180–191.

Rodriguez, P.C., Zea, A.H., Culotta, K.S., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., and Ochoa, A.C. (2002). Regulation of T Cell Receptor CD3 ζ Chain Expression by Arginine. *J. Biol. Chem.* 277, 21123–21129.

Russo, R.C., Garcia, C.C., Teixeira, M.M., and Amaral, F.A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *10*, 593–619.

Sander, L.E., Sackett, S.D., Dierssen, U., Beraza, N., Linke, R.P., Müller, M., Blander, J.M., Tacke, F., and Trautwein, C. (2010). Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.* *207*, 1453–1464.

Shindo, Y., McDonough, J.S., Chang, K.C., Ramachandra, M., Sasikumar, P.G., and Hotchkiss, R.S. (2017). Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *J. Surg. Res.* *208*, 33–39.

Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C.M., et al. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* *315*, 801–810.

T. M. Therneau and P. M. Grambsch. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer-Verlag, New York, 2000.

Uhel, F., Azzaoui, I., Grégoire, M., Pangault, C., Dulong, J., Tadié, J.-M., Gacouin, A., Camus, C., Cynober, L., Fest, T., et al. (2017). Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Septic Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*

Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* *19*, 108–119.

Vincent, J.-L., Marshall, J.C., Namendys-Silva, S.A., François, B., Martin-Loeches, I., Lipman, J., Reinhart, K., Antonelli, M., Pickkers, P., Njimi, H., et al. (2014). Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir. Med.* *2*, 380–386.

Wang, J.-F., Li, J.-B., Zhao, Y.-J., Yi, W.-J., Bian, J.-J., Wan, X.-J., Zhu, K.-M., and Deng, X.-M. (2015). 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. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* *122*, 852–863.

Ward, N.S., Casserly, B., and Ayala, A. (2008). The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients. *Clin. Chest Med.* *29*, 617–viii.

Wu, T., Zhao, Y., Wang, H., Li, Y., Shao, L., Wang, R., Lu, J., Yang, Z., Wang, J., and Zhao, Y. (2016). mTOR masters monocytic myeloid-derived suppressor cells in mice with allografts or tumors. *Sci. Rep.* *6*, 20250.



Table 1

		All patients	Infections	Sepsis	Septic Shock	Healthy Control
# Patients (%)		57	16 (28)	21 (37)	20 (35)	13
Age, yr (SD)		57 (±18)	48 (±17)	64 (±18)	57,5 (±15)	31 (±8)
Gender	Male, n (%)	30 (52,6)	6 (37,5)	14 (67)	10 (50)	6 (46)
	Female, n (%)	27 (47,4)	10 (62,5)	7 (33)	10 (50)	7 (54)
SOFA, median (Q1 ; Q3)			0 (0; 1)	5 (2; 6)	10 (8; 12,5)	
Length of ICU stay, median (Q1 ; Q3)			0	1 (0; 7)	8,5 (6; 16)	
Mortality within 30d, n (%)		4 (7)	0	2 (9,5)	2 (10)	
Site of infection	Intra-abdominal, n (%)	16 (28)	2 (12)	8 (38)	6 (30)	
	Pneumonia, n (%)	9 (16)	3 (19)	4 (19)	2 (10)	
	Urinary tract, n (%)	12 (21)	7 (44)	1 (5)	4 (20)	
	Skin, n (%)	3 (5)	0	2 (9)	1 (5)	
	Others, n (%)	16 (28)	4 (25)	6 (28)	6 (30)	
	Unknown, n (%)	1 (2)	0	0	1 (5)	
Microbiology	Gram positive, n (%)	13 (23)	0	6 (29)	7 (35)	
	Gram negative, n (%)	22 (39)	8 (50)	6 (29)	8 (40)	
	Multi-pathogen, n (%)	3 (5)	1 (6)	0	2 (10)	
	Unknown, n (%)	19 (33)	7 (44)	9 (43)	3 (15)	
Secondary Infections, n (%)		3 (5)	0	0	3 (15)	
WBC G/L (Q1 ; Q3)			15,1 (10,6; 20,3)	9,3 (7,8; 13,5)	15,1 (6,2; 20,1)	6,5 (5,7; 8,8)
PNN G/L (Q1 ; Q3)			12,5 (8,7; 14,9)	8,8 (6,3; 11,2)	14,7 (4,7; 18,5)	3,8 (3,1; 5,7)
Lymphocytes G/L (Q1 ; Q3)			1,12 (0,93; 1,44)	0,68 (0,41; 0,99)	0,57 (0,33; 1,45)	2,1 (1,7; 2,3)
Platelets G/L (Q1; Q3)			234 (219; 279)	144 (73; 210)	99 (47; 160)	210 (119; 248)
Bone marrow sample, n (%)		20 (35)	0	7 (33)	13 (65)	

Table 1: Demographic data of cohort of patients: SD = Standard Deviation, ICU = Intensive Care Unit, Q1 = Quartile 1, Q3 = Quartile 3, G/L = giga/liter.



Figure 1

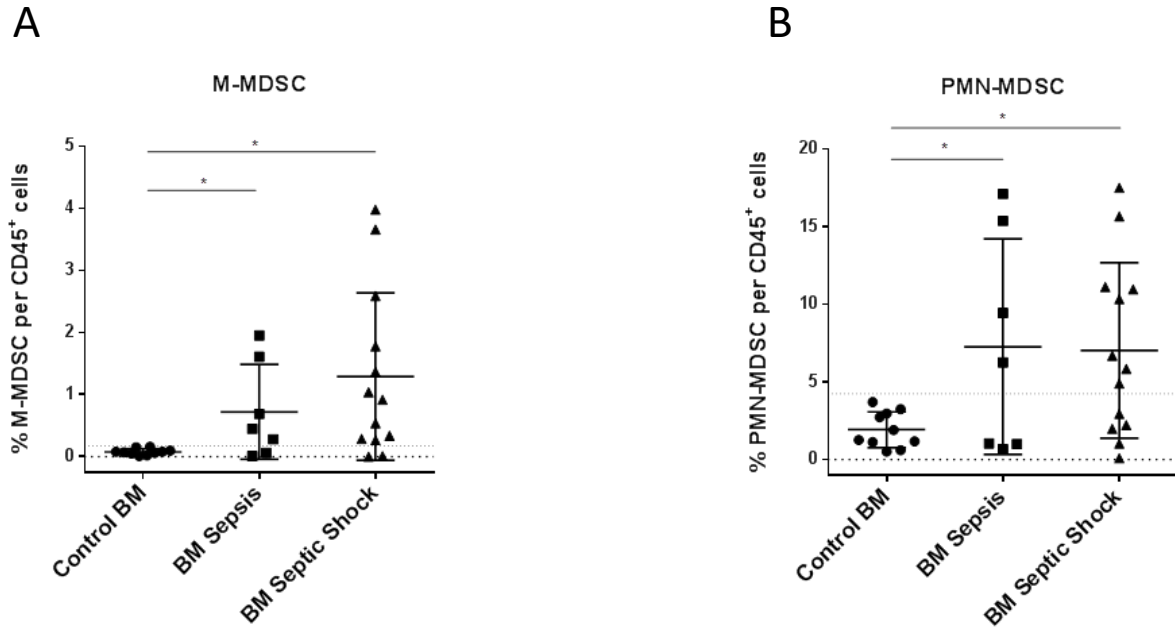


Figure 2

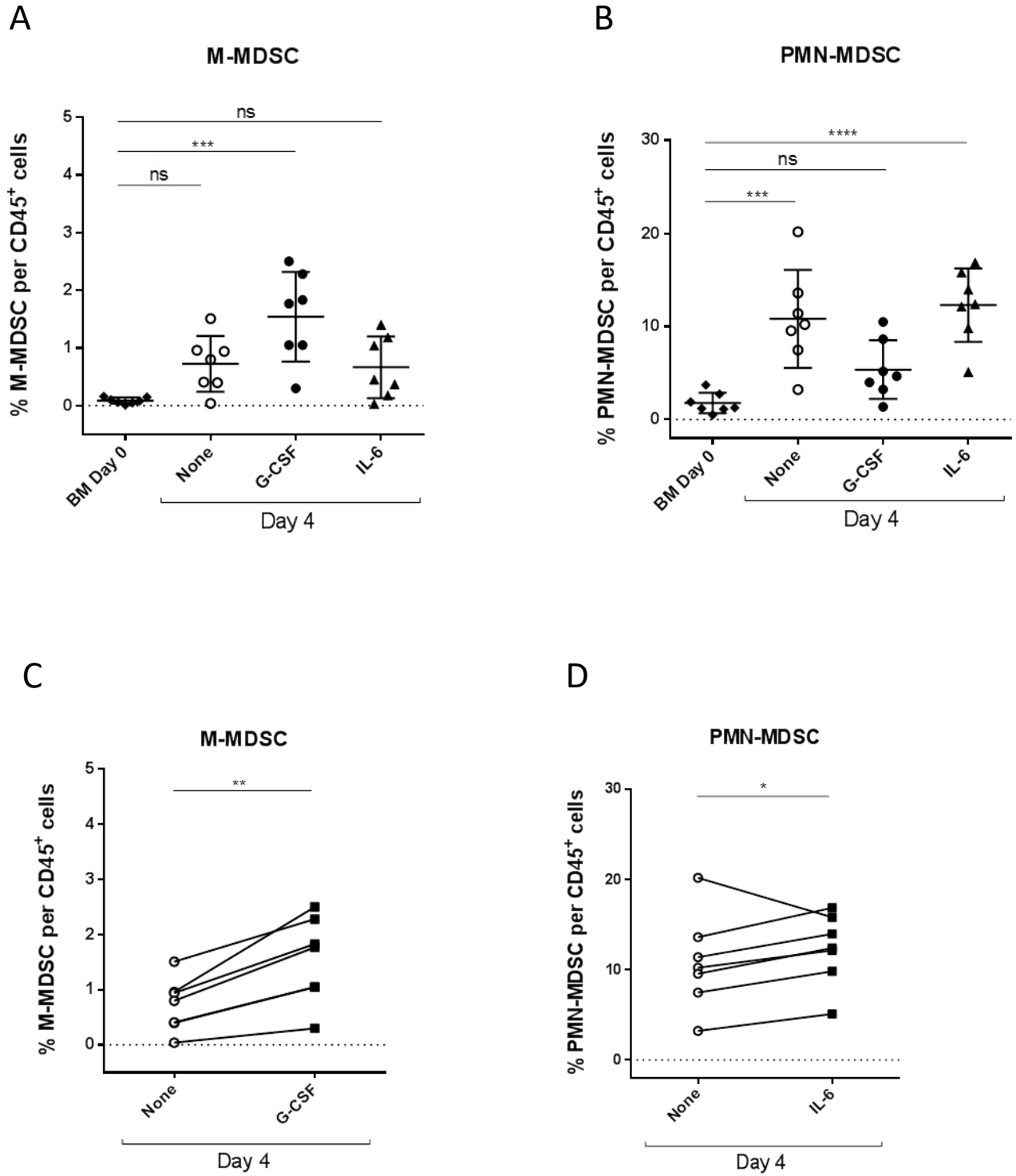


Figure 3

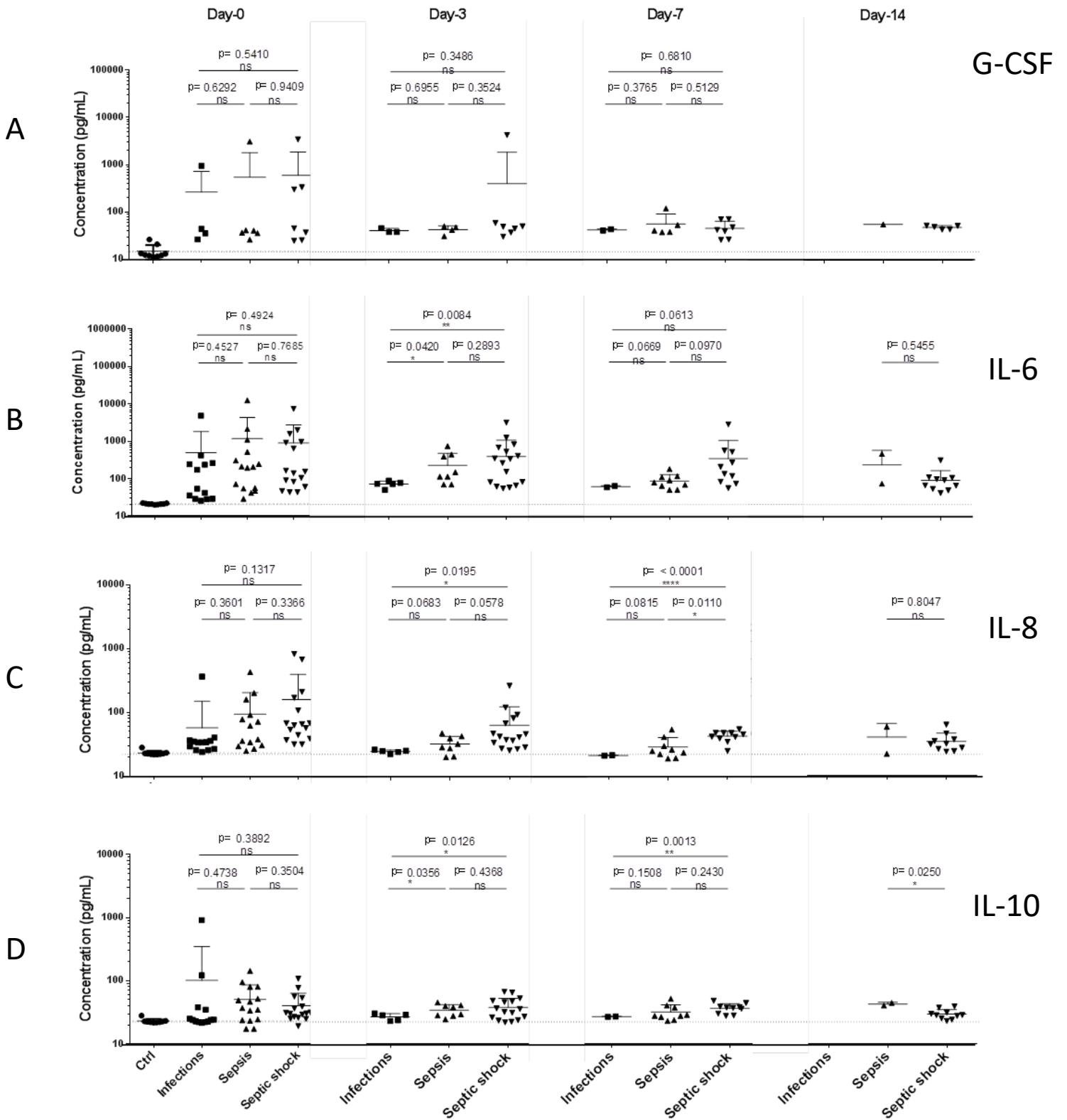


Figure 4

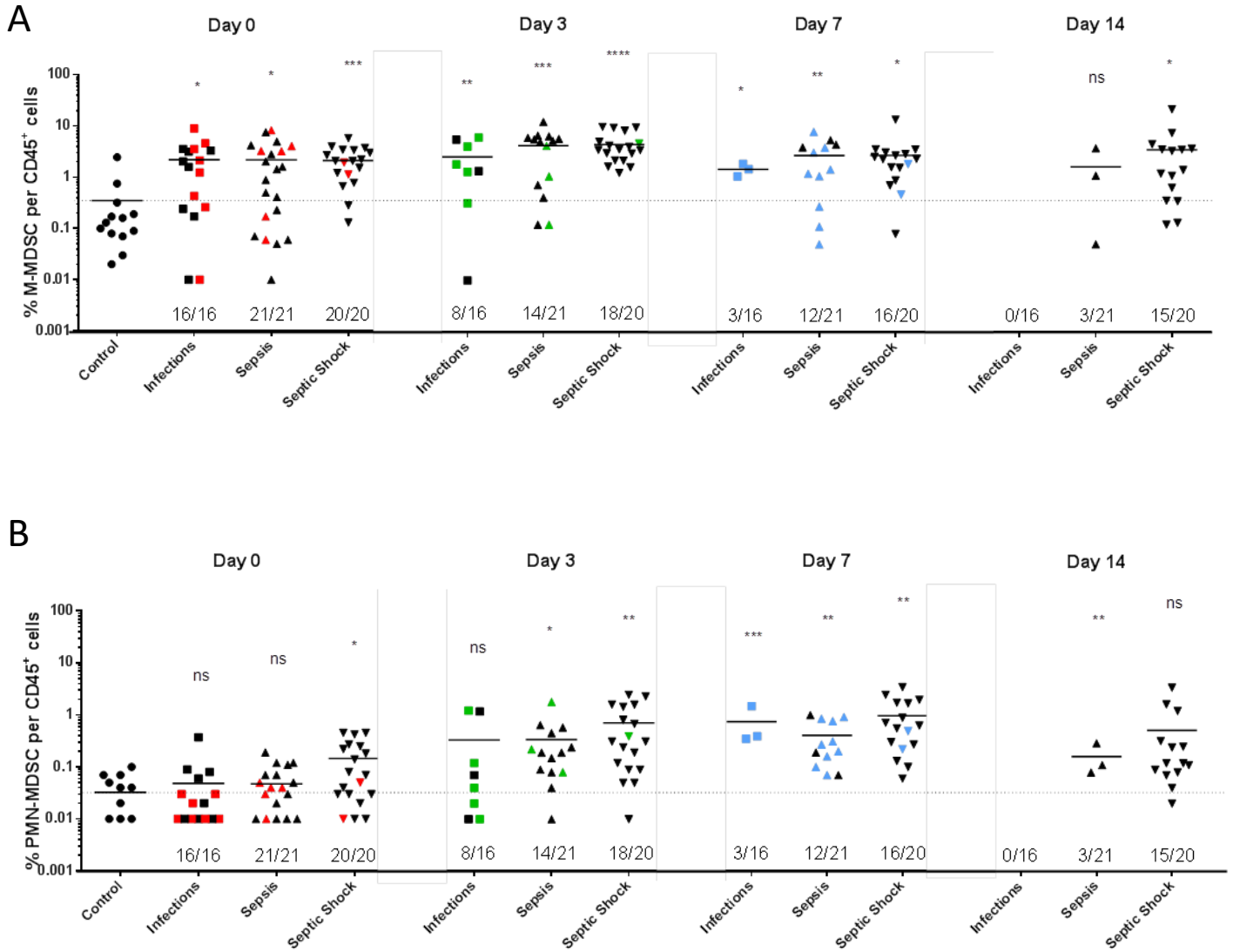


Figure 5

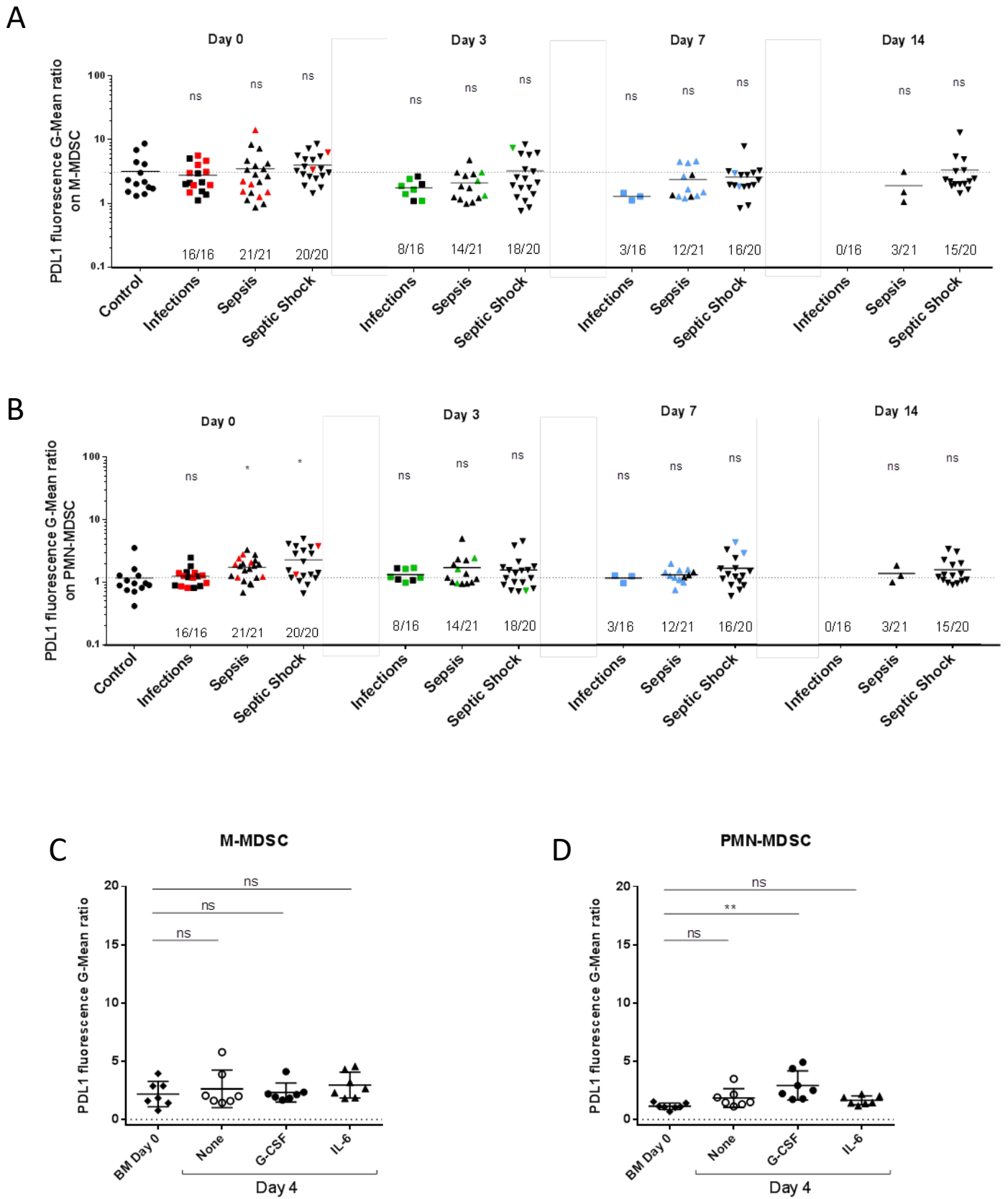
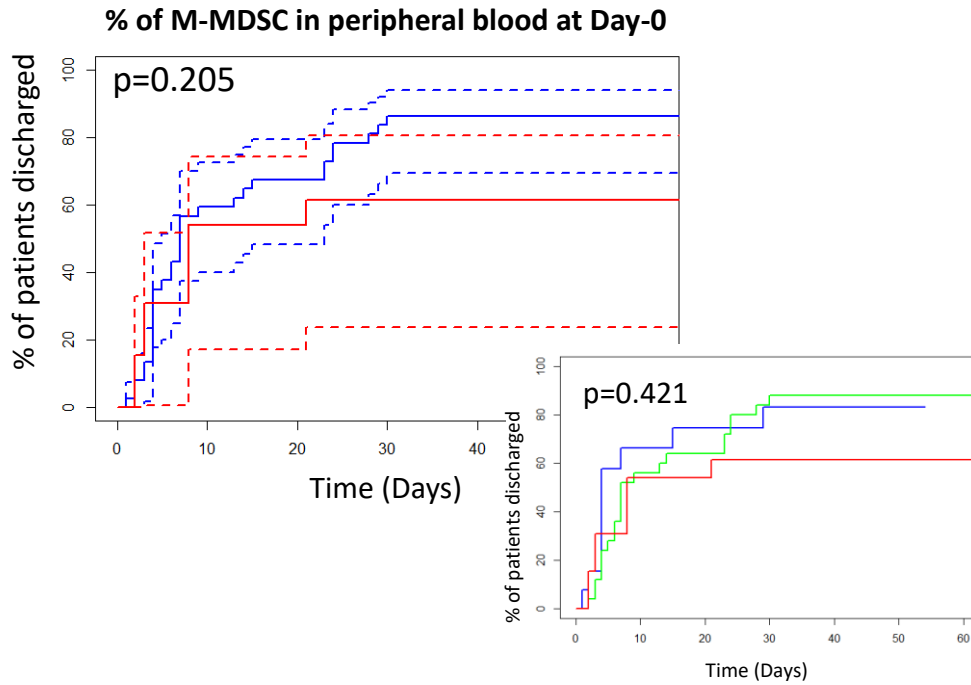


Figure 6

A



B

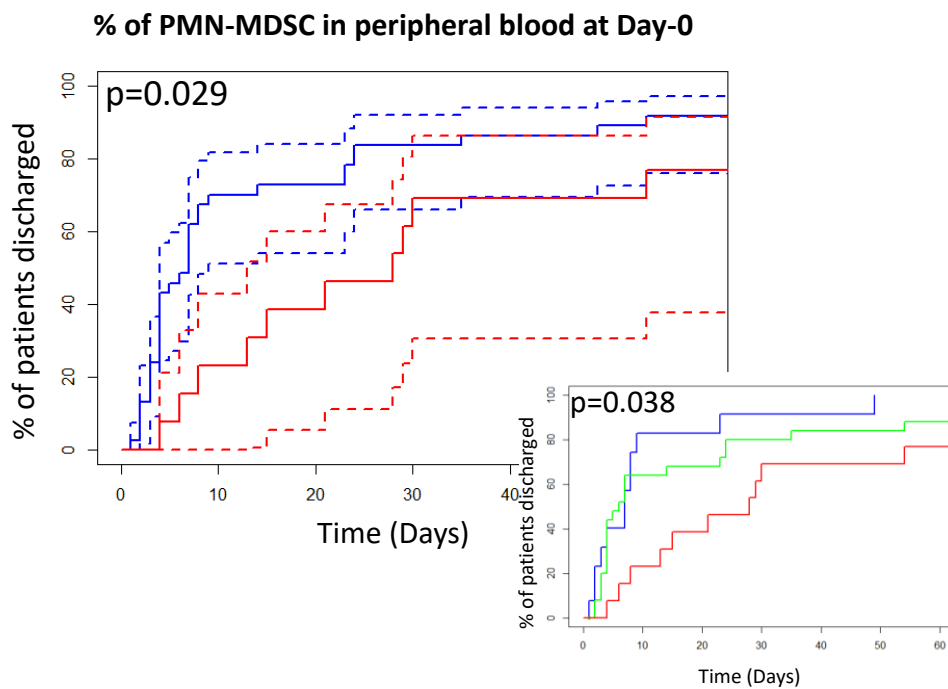


Figure 1: Bone marrow levels of M and PMN-MDSCs were increased in septic patients at admission in ICU: A) Percentages of M-MDSC and B) PMN-MDSC among CD45⁺ leucocytes in bone marrow were significantly increased in sepsis (n=7) and septic shock (n=13) patients compared to control bone marrow (=10). Threshold ± 2 SD (M-MDSC = 0,176 ; PMN-MDSC = 4,240); *p<0.05

Figure 2: Production of M and PMN-MDSCs from bone marrow cells were differently regulated by G-CSF and IL-6: A) M-MDSC and B) PMN-MDSC percentages after 4 days of *in vitro* culture of normal bone marrow in IMDM, with or without G-CSF, IL-6 (40ng/mL). (n=7). When compared to the non-treated condition, C) G-CSF tended to homogeneously increase M-MDSC production (ratio paired t-test: p=0.0023) and D) IL-6 tended to homogeneously increase PMN-MDSC production (ratio paired t-test: p=0,0279). ***p<0.001; ****p<0.0001; ns = non-significant.

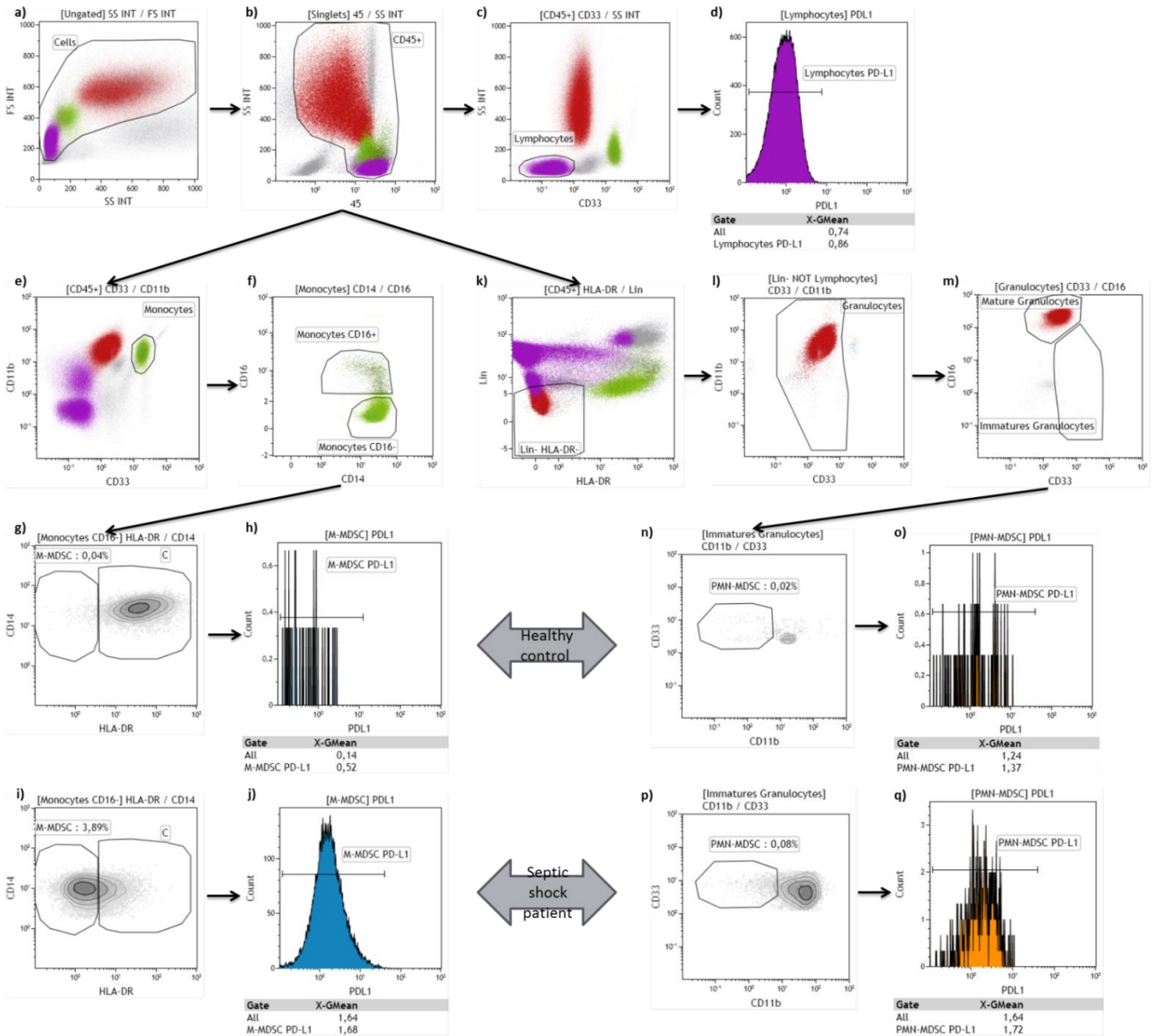
Figure 3: Cytokines profile of patients with infection, sepsis or septic shock over 14 days: G-CSF (A), IL-6 (B), IL-8 (C) and IL-10 (D) concentrations (pg/mL) in plasma of control, infection, sepsis or septic shock patients, at D0, D3, D7 and D14. Increase at D0 of cytokines concentrations in patients compared to healthy subjects. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; ns = non-significant.

Figure 4: Kinetics of M and PMN-MDSC are different during sepsis: A) M-MDSC percentages were significantly increased in peripheral blood of patients with infection (n=16), sepsis (n=21) and septic shock (n=20) when compared with healthy controls at all time-points. B) PMN-MDSC percentages were significantly increased in peripheral blood of patients with septic shock at D0. Red, green and blue dots point on patients that were discharged before Day-3, Day-7 and Day-14 respectively. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; ***p<0,001, **** p< 0,0001, ns = non-significant.

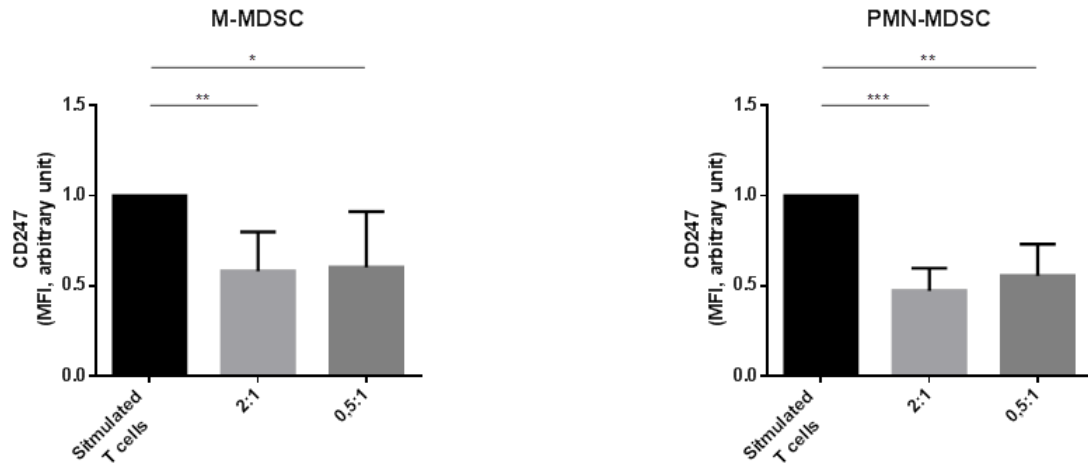
Figure 5: PD-L1 expression was increased on PMN-MDSCs from patients with sepsis and septic shock: When compared to control (n=13), PD-L1 expression was unchanged on **A) M-MDSC**, but was significantly increased on **B) PMN-MDSC** in peripheral blood of patients with sepsis (n=21) and septic shock patients (n=20). **C) PD-L1 expression on M-MDSC** and **D) PMN-MDSC** in bone marrow after 4 days of cultured with or without G-CSF or IL-6. (n=7). Red, green and blue dots point on patients that were discharged before Day-3, Day-7 and Day-14 respectively. *p<0,05 ; ns =non-significant ; Geo-Mean : Geometric mean.

Figure 6: High levels of peripheral blood PMN-MDSCs were associated with prolonged hospitalization. Cumulative incidence curves of **A) M-MDSCs** and **B) PMN-MDSCs** were established according to cell circulating levels. Red and blue curves correspond to patients with levels of M or PMN-MDSCs above or below the third quartile. Dashed lines indicate the 95% confidence interval. Inserts show the decomposition of blue curves between patients with cell levels below the first quartile (blue) and in between the first and the third quartile (green). Log-rank p-values are given on the top left of each graph

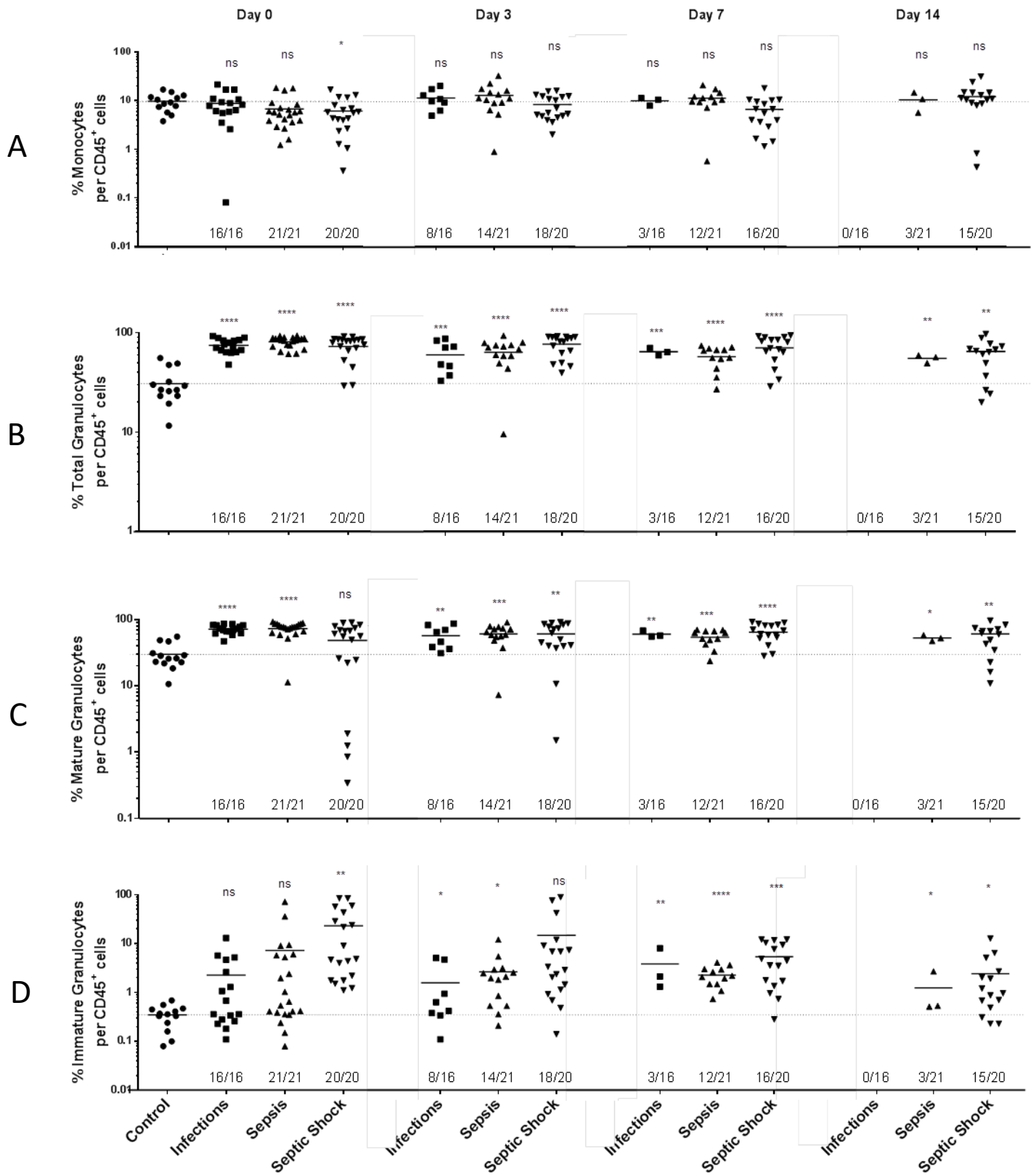
Supplemental Figure 1



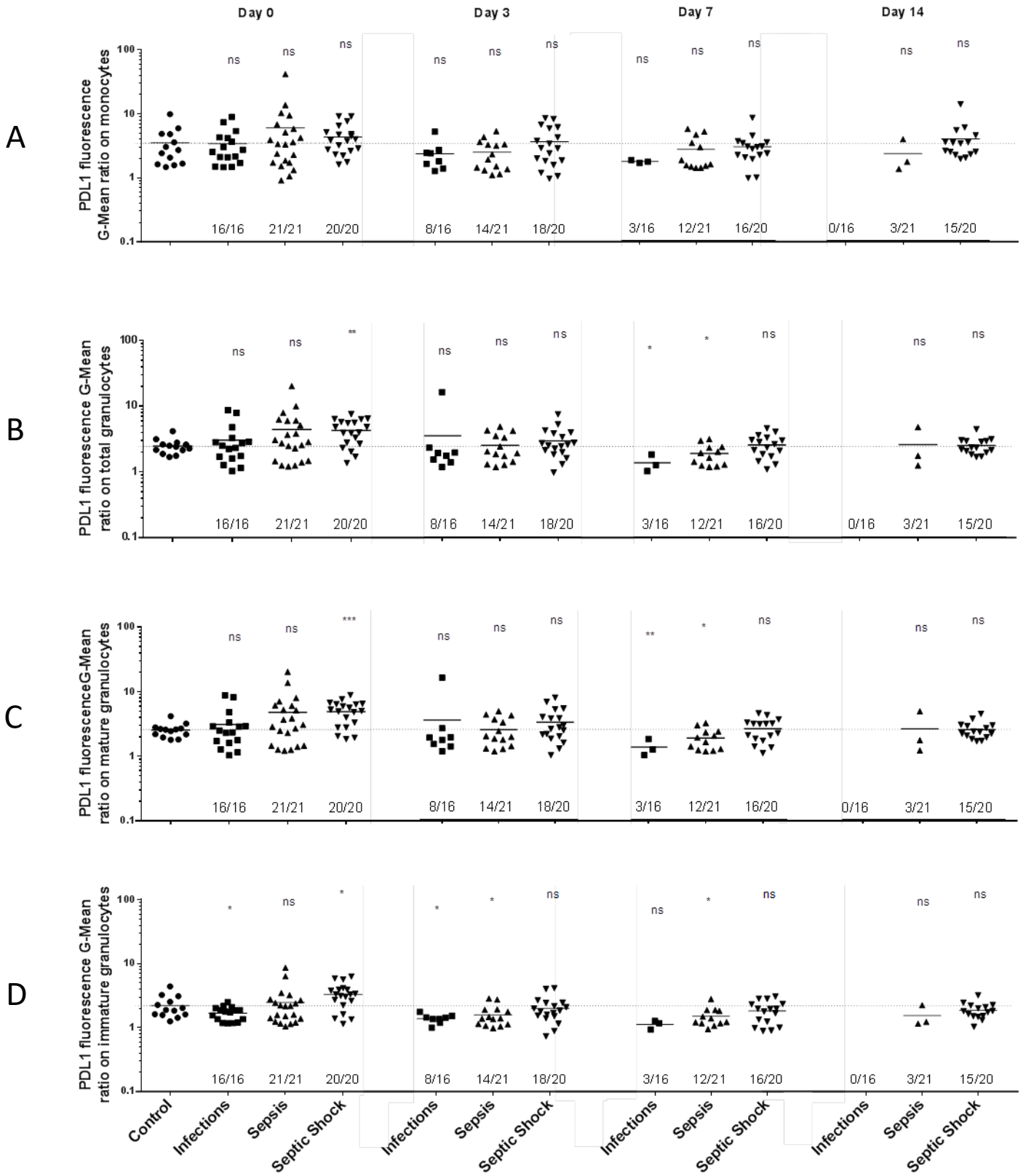
Supplemental Figure 2



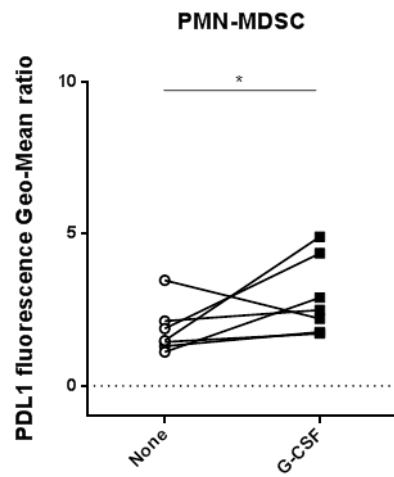
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 1: Flow cytometry gating Strategy: a) FSC / SSC gating ; b) CD45⁺ cells ; c) Isolation of lymphocytes CD33⁻ ; d) PD-L1 expression on lymphocytes ; e) CD11b⁺ / CD33⁺ ; f) Activated monocytes CD14⁺ / CD16⁺ and monocytes CD14⁺ / CD16⁻ ; g and h) CD14⁺ CD16⁻ HLA-DR⁻, M-MDSC and PD-L1 expression on M-MDSC in an healthy subject ; i and j) CD14⁺ CD16⁻ HLA-DR⁻, M-MDSC and PD-L1 expression on M-MDSC in a septic shock patient at D0; k) Lin⁻ HLA-DR⁻ ; l) Total granulocytes CD33^{dim} ; m) Mature granulocytes CD16⁺ and immature granulocytes CD16^{low/-} ; n and o) CD33^{dim} CD11b^{dim}, PMN-MDSC and PD-L1 expression on PMN-MDSC, in an healthy subject ; p and q) CD33^{dim} CD11b^{dim}, PMN-MDSC and PD-L1 expression on PMN-MDSC, in a septic shock patient at D0.

Supplemental Figure 2: purified PMN-MDSC and M-MDSC were able to inhibit T cells *in vitro*: expression of CD3 ζ subunit of the TCR complex (CD247) on CD3⁺ T cells were measured after 4 days of co-cultured with HLA-DR^{low} Lin⁻ CD33⁺ CD14⁺ or Lin⁻ CD33^{dim} CD14⁻ CD11b⁺ CD16⁻ with a ratio of 2 MDSC for 1 T cell or 0,5 MDSC for 1 T cell. Controls are T cells were stimulated with CD2/CD3/CD28 beads. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; ***p<0,001.

Supplemental Figure 3: Percentages of monocytes (A), total granulocytes (B), immatures (C) and matures (D) granulocytes, in patients with infection, sepsis or septic shock, compared to control. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; ***p<0.001; ****p<0.0001; ns = non-significant.

Supplemental Figure 4: PD-L1 expression on monocytes (A), total granulocytes (B), immatures (C) and matures (D) granulocytes, in patients with infection, sepsis or septic shock, compared to control. * p<0,05; ***p<0.001; ns = non-significant.



Supplemental Figure 5: G-CSF tended to increase levels of PD-L1 expression on PMN-MDSC. Ratio paired t-test ($p=0,0402$).

Chapitre II. Evaluation de l'immunodépression chez les patients septiques

II.1. Introduction

Comme nous l'avons décrit en introduction, lors du sepsis divers bouleversements immunologiques se produisent, conduisant en une immunosuppression générale du patient. Il est possible d'observer une apoptose importante des L_T , la diminution de leurs fonctions effectrices, une diminution du marqueur HLA-DR à la surface des monocytes traduisant d'une baisse de leur capacité à présenter l'antigène (Hotchkiss *et al.*, 2013). Ces événements conduisent en un affaiblissement de l'immunité. La réactivation de virus latent est un événement fréquent qui peut se manifester lorsque le système immunitaire est affaibli.

Peu de données existent à ce jour concernant la réactivation virale au cours du sepsis. Néanmoins, Walton et son équipe ont recherché l'ADN viral dans le sang de patients septiques et ont montré une augmentation du taux de différents ADN viraux, lorsqu'ils les ont comparé à des sujets sains (Walton *et al.*, 2014). Différents virus ont été étudiés au cours de ce travail : le Torque Teno Virus (TTV), le Cytomégalovirus (CMV), le Virus d'Epstein-Barr (EBV) et le Virus Herpès Simplex (HSV).

Le TTV constitue un bon candidat quant au suivi du statut immunitaire du patient, et a déjà été étudié dans le cadre de transplantations d'organes. Différentes études montrent une relation entre la profondeur de l'immunosuppression et la charge virale en TTV (Focosi *et al.*, 2015; Maggi *et al.*, 2011; Shibayama *et al.*, 2001). Il a donc été proposé d'utiliser la charge virale du TTV comme biomarqueur de l'immunocompétence des patients.

Suite aux résultats obtenus montrant une augmentation significative de la quantité de M-MDSC et de PMN-MDSC dans le sang des patients septiques, nous avons souhaité préciser l'impact des MDSC sur la charge virale du TTV au cours du sepsis

L'objectif de ce travail, constituant également une partie de mon travail de thèse, est de corréler la fréquence des populations de MDSC présentes chez les patients, avec leurs



résultats cliniques. Nous étudierons donc l'immunosuppression et notamment la réactivation du Torque Teno Virus.

II.2. Matériel et méthode

II.2.1. Extraction de l'ADN viral

L'ADN viral est extrait soit :

- à partir du plasma des patients, prélevés après centrifugation du sang total, et conservés en aliquotes de 250µL à -80°C
- soit à partir des leucocytes totaux, obtenus après lyse des globules rouges à l'aide du *Red Blood Cell Lysis Buffer* (BioLegend). Ces échantillons sont conservés à -80°C en culots secs de $2,5 \cdot 10^6$ cellules, et sont resuspendus dans 200µL PBS pour l'extraction.

L'ADN viral est extrait grâce au kit SaMag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Sacace Biotechnologies) selon le protocole du fabricant. Ce kit est adapté pour l'extraction d'acides nucléiques viraux (ADN ou ARN), à partir d'échantillons biologiques humains, tels que l'urine, le plasma, et autre liquide biologique dépourvu de cellules.

L'extraction est réalisée sur un automate SaMag-12 (Sacace Biotechnologies), et consiste en une succession d'étapes de lyse, de fixation, de lavages et d'éluion, telles que présentées dans la figure ci-dessous (**Figure 19**):

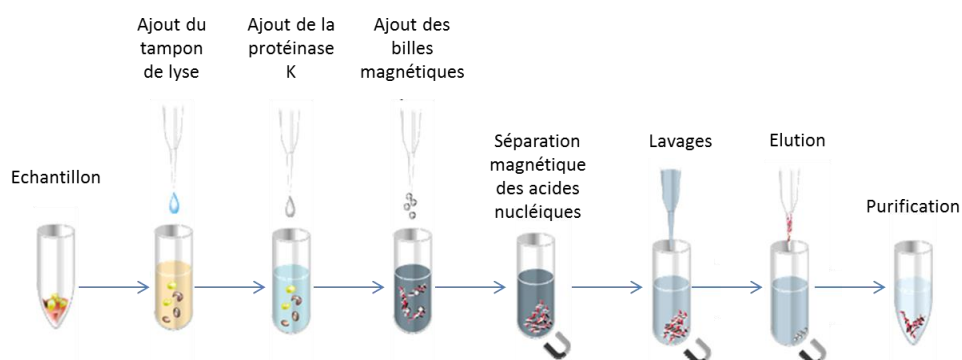


Figure 19 : Protocole d'extraction des acides nucléiques grâce au kit SaMag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Sacace Biotechnologies).

II.2.2. PCR en temps réel (qPCR) et analyses des résultats

Les charges virales du TTV sont ensuite évaluées par PCR en temps réel (qPCR) utilisant un kit de détection et de quantification en temps réel de chez Argene (Biomérieux): la trousse TTV R-gene® (Research Use Only). Le kit TTV R-gene® est capable de détecter et quantifier le génome du TTV humain, dans des échantillons de plasma et de sang. La taille de l'amplicon est de 128 paires de bases et est située dans la région 5'-UTR. La gamme servant à quantifier le génome du TTV est réalisée à l'aide de 4 standards fournis dans le kit et dont les concentrations vont de 5 copies/ μ L à 5 000 copies/ μ L (soit 0,7 \log_{10} à 3,7 \log_{10} copies/ μ L). La limite de détection du TTV dans le plasma est de 167 copies/mL, et de 146 copies/mL dans le sang total (soit environ 2,20 \log_{10} copies/mL). La limite haute de détection est de 22,4.10⁶ copies/mL (7,35 \log_{10} de copies/mL).

La qPCR est réalisée grâce au CFX96-BioRad System. Les résultats sont exprimés en copies/mL d'échantillon et sont validés à l'aide de différents contrôles :

- un contrôle de sensibilité de la PCR correspondant à un échantillon contenant 1 copie/ μ L du génome du TTV,
- un contrôle d'extraction ajouté à l'échantillon de plasma avant le début de l'extraction des ADN viraux.

L'interprétation des résultats est réalisée à l'aide du logiciel CFX Manager.

II.2.3. Analyses statistiques

Les corrélations entre la charge virale de TTV et la quantité de MDSC dans le sang des patients sont réalisées grâce à GraphPad Prism, et la significativité statistique est déterminée par le calcul d'une régression linéaire avec un intervalle de confiance de 95%. Les corrélations entre la charge virale de TTV et les nombres absolus de lymphocytes et de monocytes sont réalisées de la même façon.



II.3. Résultats

II.3.1. Etude de la réactivation virale au cours du sepsis

Au total, sur les 57 patients inclus dans l'étude, la charge virale du TTV a été quantifiée dans 39 plasmas et 37 culots leucocytaires.

Parmi les 39 plasmas testés, seuls 17 échantillons se sont révélés positifs pour le TTV au jour 0 (jour d'hospitalisation des patients). Au sein de ces 17 échantillons, nous avons remarqué un très faible nombre de patients positifs pour le TTV, dans le groupe choc septique. En effet, seulement 2 patients (sur 14 testés) ont une charge virale quantifiable dans le plasma. 9 plasmas du groupe sepsis (sur 13 testés) et 6 plasmas du groupe infection (sur 12 testés) se sont révélés positifs pour le TTV.

Parmi les 36 culots cellulaires testés, 25 échantillons se sont révélés positifs pour le TTV au jour 0. Au sein de ces 25 échantillons, 6 patients du groupe infection (sur 9 testés), 11 patients du groupe sepsis (sur 13 testés) et 8 patients du groupe choc septique (sur 14 testés), ont une charge virale de TTV quantifiable dans leurs leucocytes.

Un groupe contrôle a été réalisé, constitué de 6 volontaires sains dont 4 se sont révélés positifs pour le TTV dans les culots de leucocytes.

Le tableau suivant (**Tableau 5**) récapitule le nombre d'échantillons testés et le nombre d'échantillons positifs pour le TTV au jour 0, pour chaque groupe de patients ou de contrôles:

Tableau 5 : Tableau récapitulatif du nombre d'échantillons testés et du nombre d'échantillons positifs pour le TTV au jour 0, pour chaque groupe de patients ou de contrôles:

	Infection	Sepsis	Choc septique	Total	Contrôles
Nombre de plasma testés	12	13	14	39	0
Nombre de plasma positifs pour le TTV	6	9	2	17	0
Nombre de culots leucocytaires testés	9	13	14	36	6
Nombre de culots leucocytaires positifs pour le TTV	6	11	8	25	4

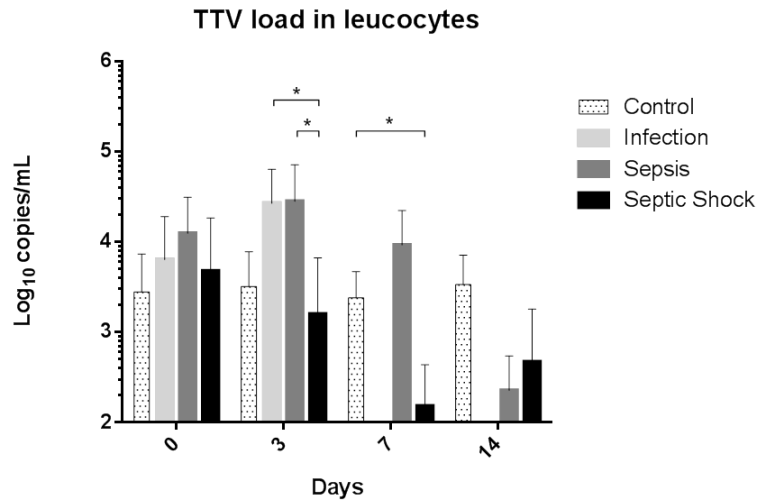


Figure 20 : Suivi de la charge virale du TTV à différents temps, chez des patients du groupe infection (n=6), sepsis (n=11) et choc septique (n=8), comparés à des sujets sains (n=4). Les graphes représentent la charge virale en log de 10 copies par millilitre d'échantillons, avec la moyenne \pm écart-type, et la significativité statistique a été déterminée par le test de Student (* $p < 0,05$).

Nous avons quantifié par qPCR, la charge virale du TTV à différents temps, chez des patients des groupes infection, sepsis et choc septique (**Figure 20**). Nous avons tout d'abord observé que la charge virale chez les volontaires sains fluctue peu au cours du temps. Au jour 0 la charge virale du TTV a une moyenne de 3.44 log₁₀ copies/mL (soit 2789 copies/mL (\pm 2289)). Elle est de 3,5 log₁₀ copies/mL au jour 3, 3,7 log₁₀ copies/mL au jour 7, et 3,53 log₁₀ copies/mL au jour 14 (3207, 2397 et 3363 copies/mL, respectivement).

Nous avons observé dans les leucocytes au jour 0, une augmentation non significative de la charge virale chez les patients comparés aux contrôles. Au jour 0, la moyenne de la charge virale du TTV est de 3,80 log₁₀ copies/mL pour le groupe infection, 4,09 log₁₀ copies/mL pour le groupe sepsis, et 3,68 log₁₀ copies/mL pour le groupe choc septique.

Au jour 3, nous observons une forte augmentation de la charge virale chez les patients des groupes infections et sepsis (en moyenne 4,43 log₁₀ et 4,45 log₁₀ copies/mL). Comparée au jour 0, la charge virale est multipliée par 4 chez les infections et par 2 chez les sepsis. Au jour 3, la charge virale du TTV est significativement plus élevée chez les patients

des groupes infections et sepsis, comparés aux patients du groupe choc septique ($3,2 \log_{10}$ copies/mL).

Aux jours 7 et 14, nous avons observé une diminution progressive de la charge virale chez les patients du groupe sepsis ($3,97 \log_{10}$ copies/mL à jour 7 et $2,35 \log_{10}$ copies/mL à jour 14). La charge virale des patients en choc septique est également diminuée aux jours 7 et 14 comparés au jour 3 ($2,18 \log_{10}$ copies/mL à jour 7 et $2,67 \log_{10}$ copies/mL à jour 14). Aucune donnée n'est disponible pour le groupe infection, les patients étant sortis de l'hôpital.

Le sepsis a donc un impact sur la charge virale du TTV, puisque celle-ci est augmentée dès les premiers jours d'hospitalisation des patients, lorsque nous les comparons aux volontaires sains.

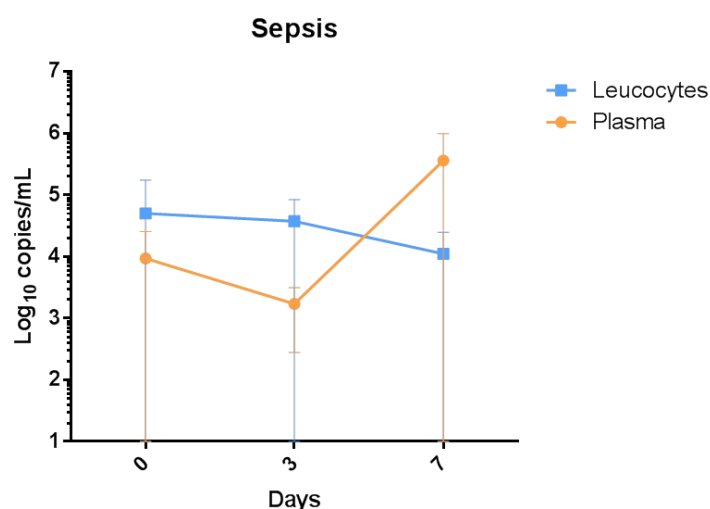


Figure 21 : Suivi de la charge virale du TTV dans le plasma ($n=9$) et les leucocytes totaux ($n=11$) au cours de l'hospitalisation de patients du groupe sepsis. Les graphes représentent la charge virale en log de 10 copies par millilitre d'échantillons, avec la moyenne \pm écart-type.

Dans la **Figure 21 :** Suivi de la charge virale du TTV dans le plasma ($n=9$) et les leucocytes totaux ($n=11$) au cours de l'hospitalisation de patients du groupe sepsis, nous comparons les charges virales du TTV retrouvées dans le plasma et dans les leucocytes



totaux des patients du groupe sepsis. Comme décrit précédemment, la charge virale du TTV dans les leucocytes tend à diminuer au cours du temps puisqu'elle est de 4,09 log₁₀ copies/mL au jour 0 et de 2,35 log₁₀ copies/mL au jour 14. En revanche, si nous considérons la charge virale dans le plasma, nous observons que celle-ci est diminuée au jour 3 comparé au jour 0, mais est significativement augmentée au jour 7. En effet, la charge virale du TTV est de 3,97 log₁₀ copies/mL au jour 0, de 3,23 log₁₀ copies/mL au jour 3, et de 4,56 log₁₀ au jour 7.

II.3.2. Corrélations entre la charge virale du TTV et le statut immunitaire

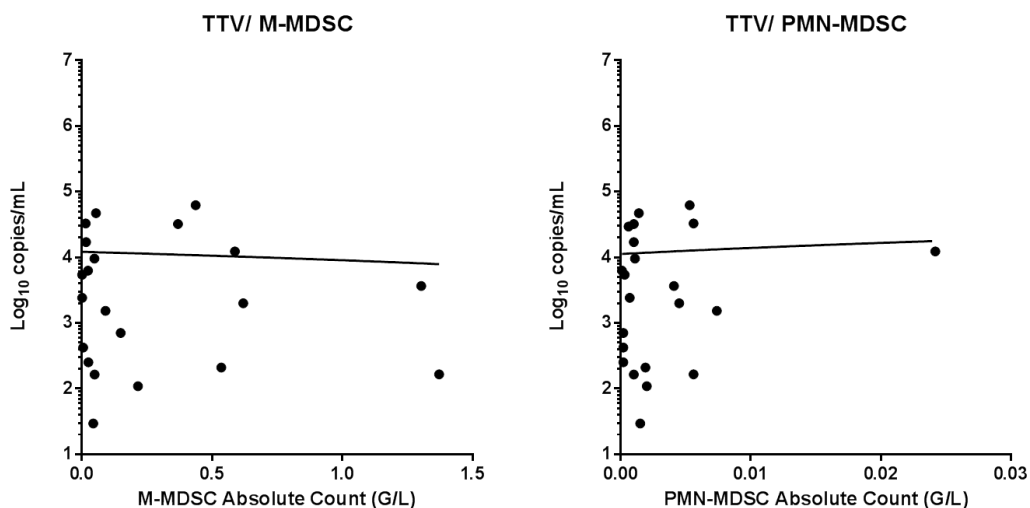


Figure 22 : Corrélation entre la charge virale au jour 0 du TTV et le nombre absolu de M-MDSC (à gauche) et de PMN-MDSC (à droite), chez les patients (infections, sepsis et choc septiques confondus). Les graphes représentent la charge virale en log de 10 copies par millilitre d'échantillons sur le nombre absolu de cellules en Giga par litre, et la significativité statistique a été déterminée par régression linéaire.

Nous avons ensuite voulu mettre en relation la charge virale du TTV avec le nombre absolu de MDSC présentes dans le sang des patients, quelle que soit la gravité (**Figure 22**). Nous n'avons observé aucune corrélation significative au jour 0 entre la charge virale du TTV et le nombre absolu de PMN-MDSC ($p=0,7270$). Aucune corrélation significative n'a été mise

en évidence non plus, entre la charge virale du TTV et le nombre absolu de M-MDSC ($p=0,7561$). Nous avons également testé ces mêmes paramètres aux jours 3 et 7, aucune corrélation n'a été démontrée.

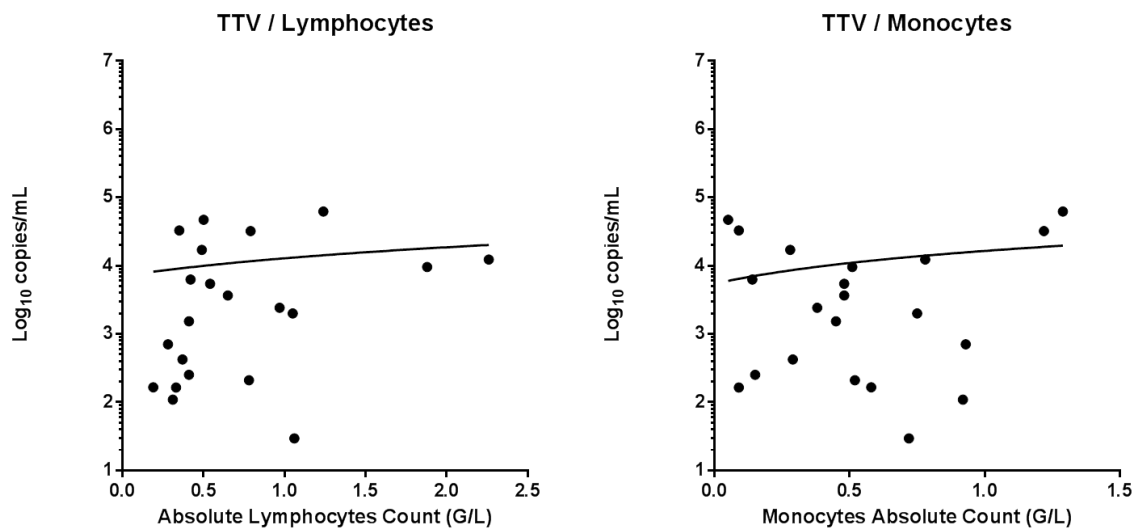


Figure 23 : *Corrélation entre les charges virales à jour 0 du TTV et le compte lymphocytaire (à gauche) ou le compte monocyttaire (à droite). Les graphes représentent la charge virale en log de 10 copies par millilitre d'échantillons sur le nombre absolu de cellules en Giga par litre, et la significativité statistique a été déterminée par régression linéaire.*

Nous avons ensuite voulu tester s'il existait une corrélation entre la charge virale du TTV et les nombres absolus de lymphocytes et de monocytes (**Figure 23**). Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la charge virale et le compte lymphocytaire ($p=0,44$), cependant nous avons observé une tendance entre ces deux paramètres. Il semblerait en effet, que la charge virale du TTV augmente avec le nombre de lymphocytes. De la même façon, aucune corrélation significative n'a été montrée entre la charge virale et le nombre absolu de monocytes ($p=0,32$).



II.4. Discussion et perspectives

Au cours de mon projet de thèse, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la fréquence de MDSC dans le sang au cours d'un sepsis. Nous avons ensuite logiquement voulu connaître l'impact de la présence de ces cellules sur le devenir du patient, et notamment sur son statut immunitaire.

Tout d'abord, et en nous inspirant des travaux de Walton et de ses collaborateurs, nous nous sommes intéressés au suivi de la charge virale du TTV chez les patients (Walton *et al.*, 2014). Dans son étude, Walton recherche le TTV dans le plasma, nous avons donc commencé par tester les échantillons de plasma de nos patients.

De façon surprenante, nous avons observé que le TTV n'a été détecté dans le plasma que chez moins de la moitié des patients testés (17 positifs sur 39 testés, soit 43,6%). Par ailleurs, seuls deux patients du groupe choc septique se sont révélés positifs. Au vu, de ce faible nombre de données, nous n'avons pas pu réaliser d'analyses statistiques satisfaisantes, nous permettant de conclure sur la charge virale du TTV dans le plasma. Dans la littérature, la prévalence en Europe de l'Ouest du TTV dans le plasma est peu documentée, mais il semblerait que le TTV ait une prévalence de l'ordre de 70 à 80% chez les patients receveurs d'organes (Görzer *et al.*, 2014; Simonetta *et al.*, 2017). Les patients inclus dans notre étude ont donc une prévalence inférieure, et nous pouvons soulever la question de l'impact du sepsis, sur la détection du TTV. Dans l'étude de Walton et de son équipe, le génome du TTV dans le plasma est détecté chez 179 patients septiques sur 231 testés, soit une prévalence de 77,5% (Walton *et al.*, 2014). En prenant en compte la prévalence chez les sujets contrôles testés dans cette étude, qui est de l'ordre de 60%, il semblerait qu'au cours du sepsis, la charge virale du TTV augmente.

Nous avons également observé dans notre étude que chez les patients positifs, la charge virale quantifiée est faible dans le plasma (3,71 log₁₀ copies/mL dans le plasma à jour 0 contre 4,73 log₁₀ copies/mL dans les leucocytes). Dans l'étude de Walton, la charge virale dans le plasma chez les patients septiques est de 64000 copies/mL (4,81 log₁₀ copies/mL), soit 12 fois plus que dans nos échantillons (Walton *et al.*, 2014). Nous pouvons alors soulever la question de la qualité des échantillons de plasma utilisés, qui ont en effet été prélevés et congelés plusieurs heures après le prélèvement (en moyenne 5 heures). Il est donc possible que le TTV soit un organisme fragile à tout changement environnemental, expliquant aussi la



difficulté de mise en culture *in vitro* de ce virus. Par ailleurs, nous pouvons aussi prendre en compte la différence de technique utilisée : la PCR quantitative réalisée dans l'étude de Walton cible la région ORF1, également utilisée par Maggi, alors que le kit TTV R-gene® cible la région UTR (Maggi *et al.*, 2003). Par conséquent, il est difficile de comparer nos études, en sachant qu'il est possible que certains génotypes soient mieux détectés en ciblant la région UTR que la région ORF1 ou inversement.

Dans les leucocytes, nous observons que chez les patients les plus graves (groupe choc septique), la charge virale du TTV est faiblement détectée, ce qui rejoint les résultats des échantillons de plasma. Dans la littérature, le sang total et le plasma sont les types d'échantillons utilisés pour la détection et la quantification du TTV. Walton et son équipe ont utilisé ces deux sortes d'échantillons, et ont observé une augmentation significative de la charge virale du TTV dans le sang total chez les patients septiques comparés aux sujets contrôles ($3,65 \cdot 10^5$ contre 63618 copies/mL) (Walton *et al.*, 2014). Comme dans notre étude, Walton *et al.* ont observé que la charge virale est plus élevée dans le sang total que dans le plasma, aussi bien chez les patients que chez les volontaires sains.

Nous avons également montré une augmentation de la charge virale du TTV au jour 0 chez les patients, comparés aux contrôles. La charge virale est encore plus élevée au jour 3, uniquement chez les patients des groupes infections et sepsis, et suit donc la même cinétique que l'inflammation. Ces résultats indiquent tout d'abord que le TTV se réplique dès les premières heures après une infection, pour atteindre un pic de charge virale au jour 3. Nous pouvons imaginer que l'inflammation causée par l'infection, qu'elle soit locale ou générale, induit une réplication du TTV. L'étude de Zheng et ses collègues, ont montré que la protéine ORF2 produite par le TTV était capable d'inhiber NF- κ B, modulant ainsi l'immunité (Zheng *et al.*, 2007). Nous pouvons alors penser que le TTV joue un rôle dans la régulation de l'inflammation dans les premiers jours du sepsis. Cependant, nous observons une diminution continue de la charge virale du TTV dans les leucocytes des patients en chocs septiques. Cette cinétique, totalement différente de celles des groupes sepsis et infection, est difficilement interprétable du fait du biais induit par la lymphopénie importante des patients en chocs septiques.

La charge virale du TTV étant augmentée chez les patients septiques de notre étude, il était alors intéressant de vérifier s'il existait une corrélation entre la fréquence de MDSC

dans le sang et la charge virale. Nous avons imaginé qu'une forte présence de MDSC pouvait être assimilée à une charge virale plus importante, du fait que ces cellules contribuent à l'immunosuppression, via l'inhibition des L_T . Contrairement à nos attentes, aucune relation n'a été trouvée entre les deux paramètres.

Pour approfondir l'étude sur la réactivation virale, nous avons étudié la relation entre la charge virale et les nombres absolus de lymphocytes et de monocytes. Les L_T étant le lieu admis de réplication du TTV, il était d'autant plus intéressant de vérifier l'existence d'une relation entre ces paramètres (Focosi *et al.*, 2015). Contrairement à nos attentes, nous n'avons observé aucune relation entre la charge virale et le nombre de lymphocytes. De la même façon, la charge virale du TTV et le nombre de monocytes circulants ne sont pas non plus corrélés.

La charge virale du TTV semble être un outil informatif sur l'inflammation et l'immunosuppression du sepsis, mais à ce jour nous ne savons pas encore l'interpréter. En cause, le manque d'informations sur sa réplication et sa physiopathologie.

Notre étude soulève aussi plusieurs questions. Le TTV est-il un vrai marqueur de gravité dans le sepsis ? La charge virale du virus est-elle liée à l'immunosuppression du sepsis ? Nous avons pu observer une différence de cinétique de la charge virale entre les groupes de patients, il est donc possible que le TTV réponde différemment à la sévérité du sepsis. A ce moment nous pouvons demander quel est le moment le plus informatif où l'on doit analyser la charge virale ? En effet il est probable que la quantification entre le jour 0 et le jour 7 soit trop précoce pour observer un impact du sepsis sur la charge virale, quand on sait que les études en transplantations d'organe sont réalisées sur 80 jours post transplantations (Kulifaj *et al.*, 2018).

Pour répondre à certaines de ces questions, il serait intéressant d'étudier l'ARNm du TTV qui nous informerait sur la réplication du virus. Nous pouvons également imaginer réaliser une étude du virome chez nos patients, dans le but d'explorer le comportement d'autres virus, tels que l'EBV, l'HHV-6 ou le CMV. Enfin, nous pouvons aussi regarder en détail les différents génotypes connus du TTV ; nous pouvons en effet penser que certains génotypes peuvent s'expandre au détriment d'autres au cours du sepsis.



Chapitre III. Evaluation de l'impact du G-CSF sur les populations myéloïdes, chez des donneurs de cellules souches hématopoïétiques

III.1. Introduction

Parallèlement à notre étude du rôle des MDSC dans le sepsis, et de leurs impacts dans l'immunosuppression de cette pathologie, nous avons souhaité nous intéresser à ces cellules dans un autre contexte.

Dans le cadre de troubles hématologiques tels que la leucémie ou le lymphome, la greffe de moelle osseuse ou la greffe de CSH sont des approches thérapeutiques qui peuvent être proposées au patient. Dans le cadre d'une greffe de CSH, un traitement par G-CSF est prescrit au donneur. Un tel traitement induit chez le donneur la production de CSH en grande quantité, et la mobilisation de ces cellules dans le sang, qui pourront alors être prélevées par la technique d'aphérèse (Deotare *et al.*, 2015, Tay *et al.*, 2017). Cette technique permet de prélever certains composants sanguins, ici les CSH, par circulation extracorporelle du sang. Parmi ces CSH, la moelle va relarguer des MDSC qui seront donc présentes dans le greffon. Luyckx et ses collègues ont montré l'effet du G-CSF sur la mobilisation au niveau périphérique de MDSC. Les pourcentages de PMN-MDSC (Lin⁻ HLA-DR⁻ CD11b⁺ CD15⁻) et de M-MDSC (Lin⁻ HLA-DR⁻ CD11b⁺ CD15⁺) sont significativement augmentés dans le sang des donneurs traités au G-CSF (Luyckx *et al.*, 2012).

Suite à une greffe de CSH ou de moelle osseuse, le receveur peut subir un conflit immunologique entre les cellules du donneur et celles du receveur donnant lieu à une maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Au cours de cette complication, les cellules immunocompétentes du greffon vont cibler les tissus de l'hôte conduisant à des lésions tissulaires sévères.

En connaissant le rôle immuno-modulateur des MDSC, leurs impacts dans les greffes de CSH et surtout dans la GvHD sont un élément clé qui est étudié depuis plusieurs années (Lv *et al.*, 2015, Vendramin *et al.*, 2014). Dans ces études, il est montré que la fréquence de

MDSC présente dans le greffon prédit le risque qu'a le patient, de développer une GvHD. Les mécanismes utilisés par les MDSC pour contrebalancer le risque de GvHD sont à ce jour peu étudiés chez l'homme. L'expression de PD-L1 par les MDSC peut être un paramètre entrant en jeu dans le caractère immunomodulateur des MDSC.

L'objectif de ce travail a donc été dans un premier d'étudier l'effet du G-CSF sur toutes les populations myéloïdes, à savoir les populations de la lignée monocyttaire et les populations de la lignée granulocytaire. Dans un second, l'expression de PD-L1 a été évaluée sur ces populations, dans le but de comprendre l'effet protecteur des MDSC présentes dans le greffon, contre la GvHD. Ces connaissances permettront à terme de moduler le contenu du greffon afin que le patient puisse bénéficier du meilleur effet GvL sans risquer de développer une GvHD.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Patients, échantillons et données cliniques

Au cours d'une période de 20 mois, 106 donneurs d'allogreffes ont été recrutés. Les donneurs sont sélectionnés à l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Bordeaux, ainsi qu'au Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren de Limoges. Les critères d'exclusion sont les mêmes que ceux de l'allogreffe, c'est-à-dire un âge compris entre 18 et 60 ans, toutes contre-indications médicales, et la nécessité du consentement du donneur. Les reliquats des prélèvements sanguins avant et après traitement au G-CSF, utilisés pour réaliser une Numération Formule Sanguine (NFS), sont collectés. De la même façon, les reliquats des prélèvements de moelle osseuse et des produits d'aphérèses sont recueillis.

Au total, nous avons inclus 17 échantillons de donneurs avant traitement au G-CSF, 27 échantillons de donneurs traités au G-CSF, 12 moelles osseuses, et 50 produits d'aphérèse.



III.2.2. Cytométrie en flux

Les immunomarquages sont réalisés sur 2.10^6 cellules ou sur un maximum de 300µL d'échantillon et sont incubés 20 minutes à température ambiante avec des anticorps couplés à des fluorochromes, permettant une analyse en cytométrie en flux à huit couleurs. Les anticorps utilisés pour l'immunomarquage des populations myéloïdes sont listés dans le tableau suivant (**Tableau 6**):

Tableau 6 : Liste des différents anticorps utilisés :

	Anticorps - Fluorochrome	Clone	Volume par test
Cocktail Lineage	CD3 – FITC	UCHT1	2,5 µL
	CD19 – FITC	HIB19	2,5 µL
	CD20 – FITC	2H7	2,5 µL
	CD56 – FITC	HCD56	2,5 µL
	CD123 – FITC	6H6	2,5 µL
	HLA-DR – PE	L243	5 µL
	CD14 – PE-CF594	MΦP9	5 µL
	CD33 – PE-Cy7	P67.6	2,5 µL
	CD274 (PD-L1) – APC	29E.2A3	2,5 µL
	CD11b – APC-Cy7	ICRF44	2,5 µL
	CD16 – BV450	3G8	5 µL
	CD45 – AmCyan	2D1	5 µL

La lyse des globules rouges est réalisée avec du *Red Blood Cell Lysis Buffer* (BioLegend) ou de la VersaLyse (Beckman). Enfin, l'acquisition est effectuée sur un cytomètre en flux Navios (Beckman), au laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren en utilisant les contrôles qualité de ce laboratoire. Le retraitement des résultats est réalisé grâce au logiciel Kaluza (Beckman) et la stratégie de fenêtrage est décrite dans la **Figure 24**. Cette analyse permet d'identifier l'ensemble des populations lymphocytaires (L_T ,

L_B) les populations de la lignée myéloïde (monocytes et M-MDSC) ainsi que les populations de la lignée granuleuse (granulocytes immatures, granulocytes matures, PMN-MDSC). Sur chacune des populations identifiées, l'expression de PD-L1 est évaluée.

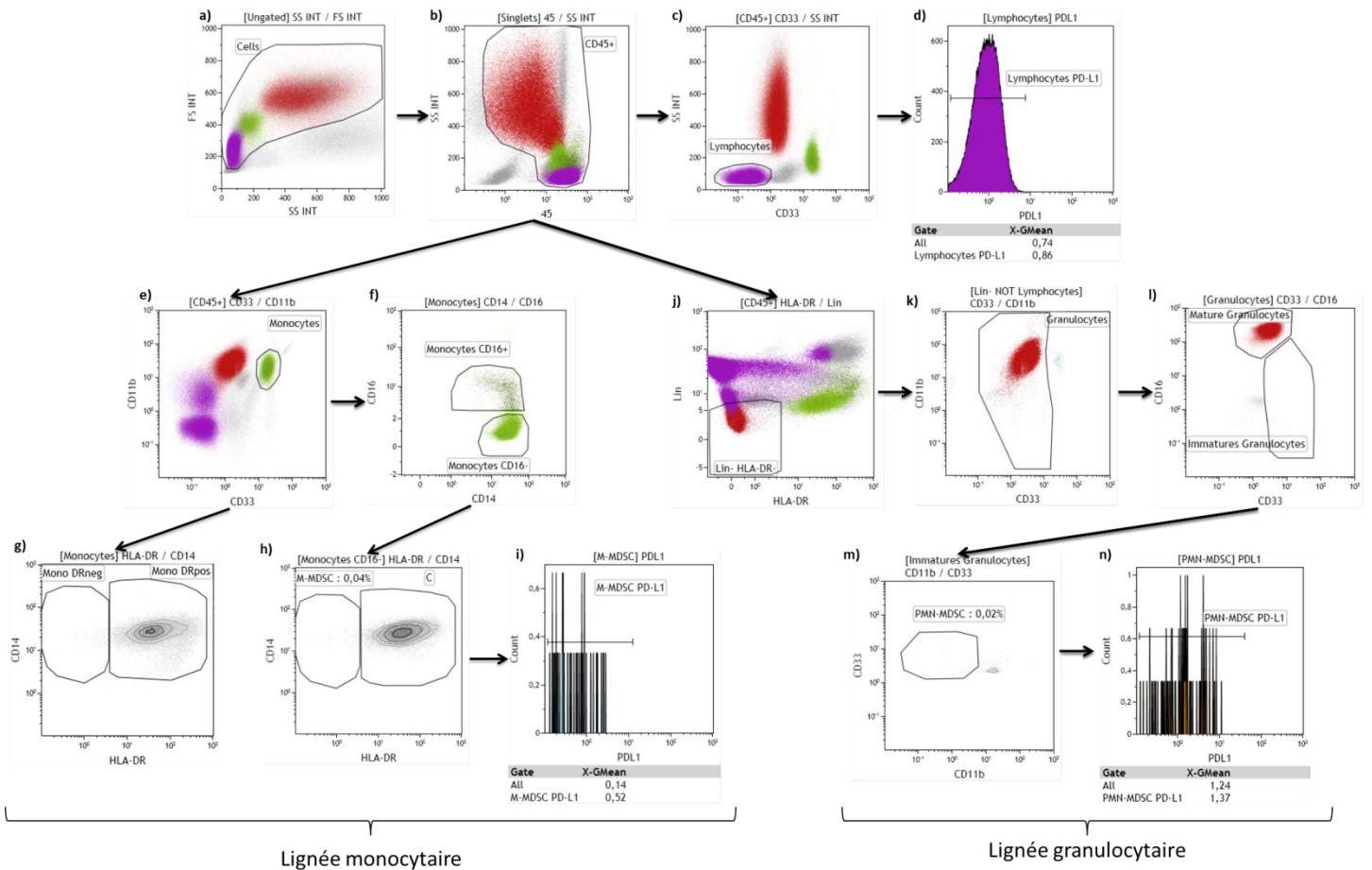


Figure 24 : Stratégie de fenêtrage utilisée : **a)** Fenêtre générale sur le FSC / SSC ; **b)** Cellules CD45⁺ ; **c)** Isolation des lymphocytes CD33⁻ ; **d)** Expression de PD-L1 par les lymphocytes ; **e)** CD11b⁺ / CD33⁺ ; **f)** Monocytes activés CD14⁺ / CD16⁺ et monocytes CD14⁺ / CD16⁻ ; **g)** Monocytes HLA-DR⁻ ; **h)** CD14⁺ CD16⁻ HLA-DR⁻, M-MDSC ; **i)** Expression de PD-L1 par les M-MDSC ; **j)** Lin⁻ HLA-DR⁻ ; **k)** Granulocytes totaux CD33^{dim} ; **l)** Granulocytes matures CD16⁺ et granulocytes immatures CD16^{int/-} ; **m)** CD33^{dim} CD11b^{dim}, PMN-MDSC ; **n)** Expression de PD-L1 par les PMN-MDSC.

III.3. Résultats

Nos expériences ont consisté à évaluer l'effet du G-CSF sur les différentes populations myéloïdes et sur leur expression de PD-L1. Pour cela, divers échantillons de donneurs de CSH ont été analysés : le sang des donneurs avant et après traitement au G-CSF, et deux types de greffon : les produits d'aphérèse, les moelles osseuses.

III.3.1. Effet du G-CSF sur les populations myéloïdes dans le sang périphérique

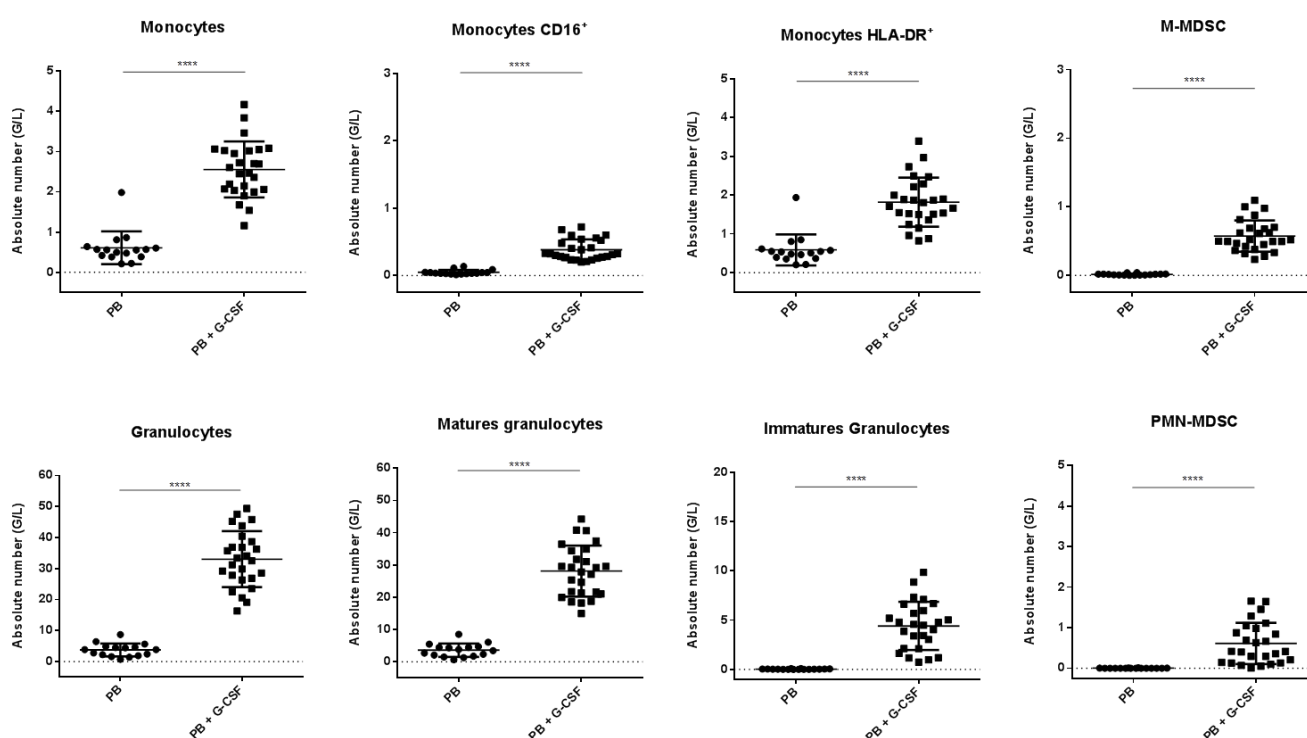


Figure 25 : Effet du G-CSF sur les nombres absolus de cellules des lignées monocytaires (en haut) et granulocytaires (en bas) dans le sang, chez des donneurs de CSH avant (n=17) et après traitement au G-CSF (n=27). Les graphes représentent le nombre absolu de cellules en Giga par litre d'échantillon, avec la moyenne \pm écart-type, et la significativité statistique a été déterminée par le test de Student (****p<0,0001).

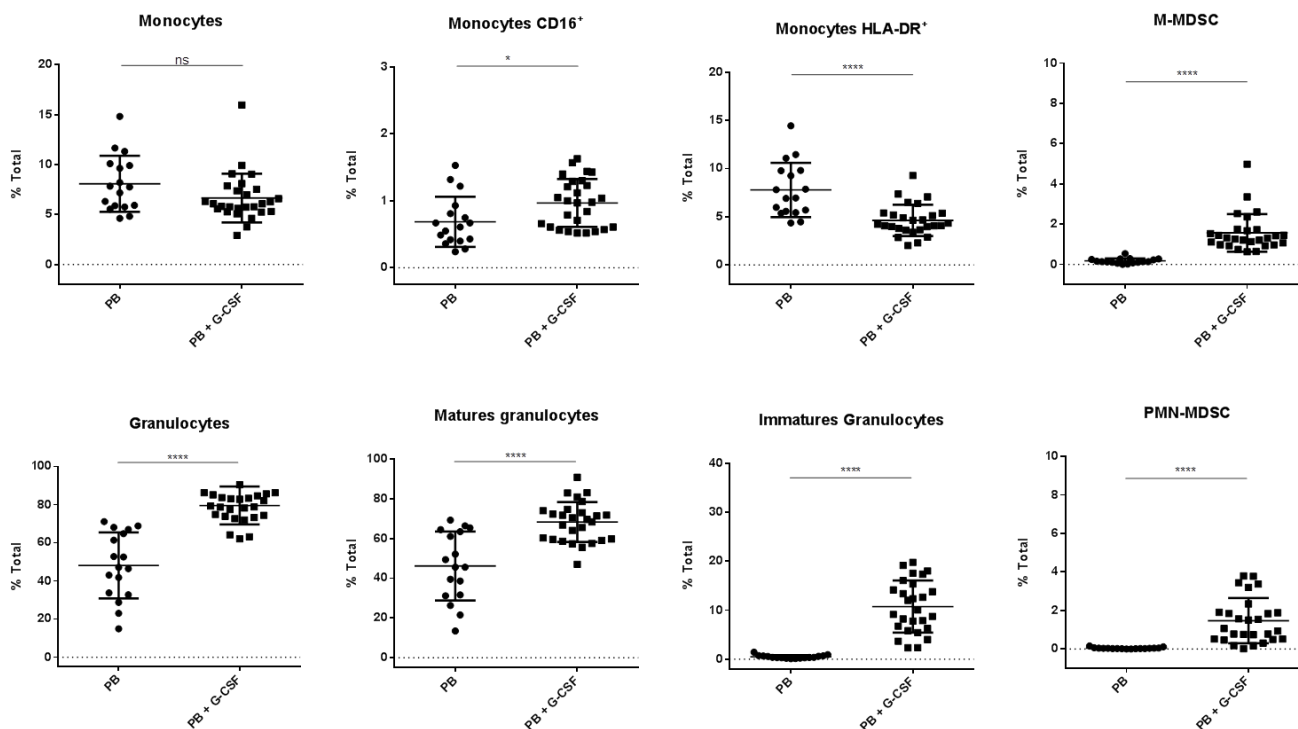


Figure 26 : Effet du G-CSF sur les pourcentages de cellules les lignées monocytaires (en haut) et granulocytaires (en bas) dans le sang, chez des donneurs de CSH avant ($n=17$) et après traitement au G-CSF ($n=27$). Les graphes représentent le pourcentage de cellules parmi les leucocytes $CD45^+$ dans l'échantillon, avec la moyenne \pm écart-type, et la significativité statistique a été déterminée par le test de Student (**** $p<0,0001$; * $p<0,05$; ns : non significatif).

Par immunomarquage des cellules myéloïdes présentes dans le sang, nous avons déterminé le nombre absolu des populations monocytaires et granulocytaires avant et après traitement au G-CSF. Nous avons observé une augmentation très significative de toutes les populations présentes dans le sang (**Figure 25**). Le nombre de monocytes totaux est significativement augmenté, puisque la moyenne est de 0,61G/L avant traitement et de 2,55G/L après G-CSF. Par ailleurs, toutes les sous-populations de monocytes sont nettement augmentées par le G-CSF : les monocytes $CD16^+$ (activés) (0,05G/L avant G-CSF et 0,38G/L après G-CSF), les monocytes $HLA-DR^+$ (0,59G/L avant G-CSF et 1,82G/L après G-CSF) et les M-MDSC (0,013G/L avant G-CSF et 0,57G/L après G-CSF). De la même façon, toutes les populations granulocytaires sont affectées par le G-CSF, puisque le nombre de granulocytes

matures, granulocytes immatures et PMN-MDSC sont significativement augmentés (granulocytes matures : 3,60G/L avant G-CSF et 28,10G/L après G-CSF ; granulocytes immatures : 0,035G/L avant G-CSF et 4,41G/L après G-CSF ; PMN-MDSC : 0,003G/L avant G-CSF et 0,61 après G-CSF).

En revanche, si nous considérons le pourcentage de ces mêmes populations dans le sang, nous n'observons que seules les fréquences des monocytes CD16⁺ et des M-MDSC sont augmentées après un traitement au G-CSF (monocytes CD16⁺ : 0,69% et 0,97% ; M-MDSC : 0,17% et 1,57%, avant et après G-CSF respectivement) (**Figure 26**). La fréquence des monocytes est quant à elle semblable que ce soit avant ou après traitement au G-CSF (6,65% et 8,07%, respectivement). En ce qui concerne les populations granulocytaires, les pourcentages sont significativement augmentés dans le sang après traitement au G-CSF, pour toutes les populations étudiées (granulocytes : 48,17% et 79,6% ; granulocytes matures : 46,23% et 68,39% ; granulocytes immatures : 0,5% et 10,75% ; PMN-MDSC : 0,04% et 1,47%, dans le sang avant et après G-CSF, respectivement).

Le G-CSF permet donc de mobiliser vers le sang toutes les populations myéloïdes, y compris les MDSC. Les fréquences et nombres absolus de M-MDSC et PMN-MDSC sont augmentés dans le sang suite à un traitement par G-CSF.



III.3.2. Comparaison de deux types de greffons : les moelles osseuses et les produits d'aphérèse

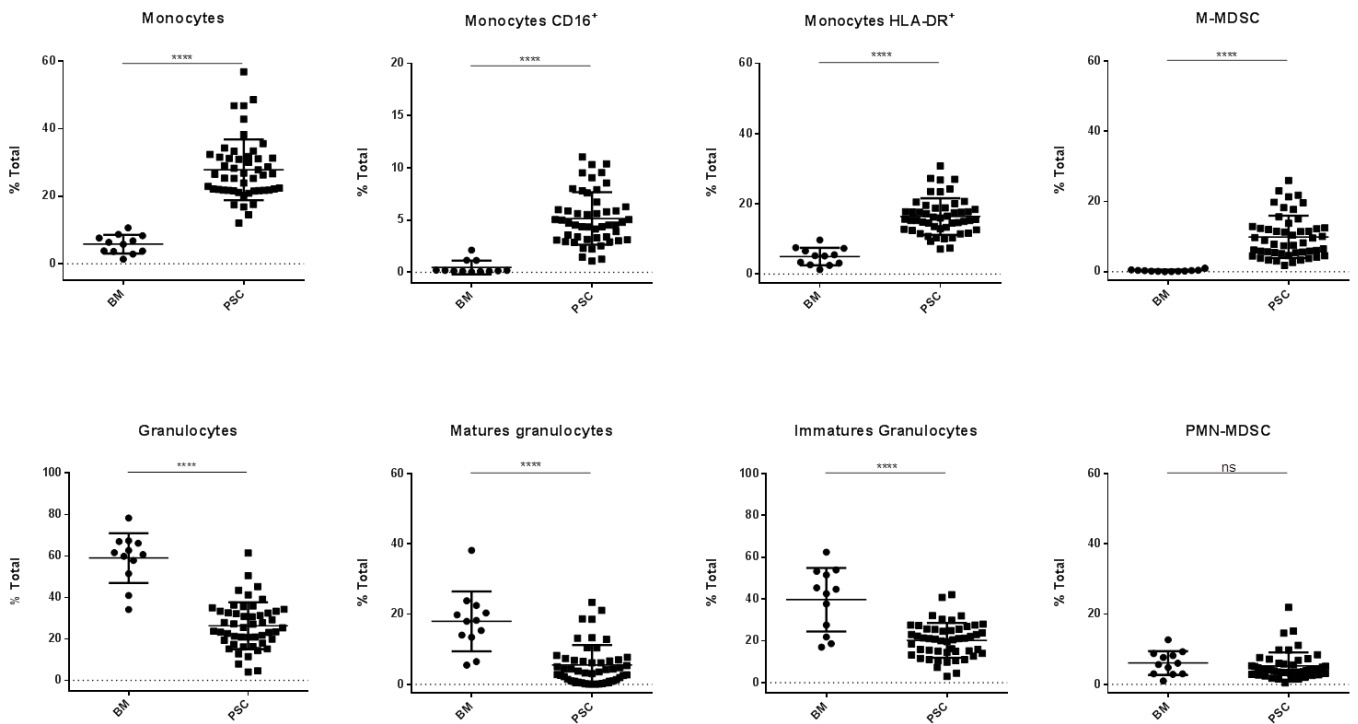


Figure 27 : Comparaison de la fréquence des populations monocytaires (en haut) et granulocytaires (en bas) dans deux types de greffons : la moelle osseuse (BM) (n=12) et le produit d'aphérèse obtenu suite à un traitement par G-CSF (PSC) (n=50). Les graphes représentent le pourcentage parmi les leucocytes CD45⁺ de chaque population dans les échantillons, avec la moyenne \pm écart-type, et la significativité statistique a été déterminée par le test de Student (**** $p < 0,0001$; ns : non significatif).

Afin d'étudier la richesse des greffons, nous avons comparé la composition en populations monocytaires et granulocytaires présentes dans la moelle osseuse (BM) et le produit d'aphérèse (PSC), obtenu après un traitement au G-CSF.

Nous avons observé que les pourcentages des populations monocytaires dans le produit d'aphérèse est très significativement supérieur aux pourcentages présents dans la moelle osseuse (**Figure 27**). Le traitement par G-CSF permet, comme nous l'avons vu précédemment, de mobiliser les monocytes dans le sang, qui sont ensuite concentrés grâce à l'aphérèse (5,82% dans la moelle osseuse et 27,83% dans le produit d'aphérèse). De

même, toutes les populations monocytaires sont significativement plus fréquentes dans le produit d'aphérèse que dans la moelle osseuse : les monocytes CD16⁺ (activés) représentent 0,47% dans la moelle osseuse et 5,16% dans le produit d'aphérèse, les monocytes HLA-DR⁺ représentent 4,98% dans la moelle osseuse contre 16,39% dans le produit d'aphérèse, et enfin les M-MDSC représentent 0,30% dans la moelle osseuse et 9,94% dans le produit d'aphérèse.

En observant les granulocytes, nous notons une diminution significative du pourcentage de granulocytes totaux dans le produit d'aphérèse par rapport à la moelle osseuse (59,04% dans la moelle osseuse contre 26,41% dans le produit d'aphérèse). Cette observation est également vraie si nous différencions les granulocytes matures (17,96% dans la moelle osseuse contre 5,48% dans le produit d'aphérèse) des granulocytes immatures (39,74% dans la moelle osseuse contre 20,26% dans le produit d'aphérèse). En revanche, nous observons que la fréquence de PMN-MDSC présentes dans la moelle osseuse est comparable à celle présente dans le produit d'aphérèse (6,09% et 5,21% respectivement).

Les deux types de greffon diffèrent en termes de composition en populations myéloïdes, puisque le produit d'aphérèse est nettement plus riche en populations monocytaires que la moelle osseuse. Cependant, cette dernière est plus riche en populations granulocytaires comparée au produit d'aphérèse.



III.3.3. Comparaison des différents échantillons

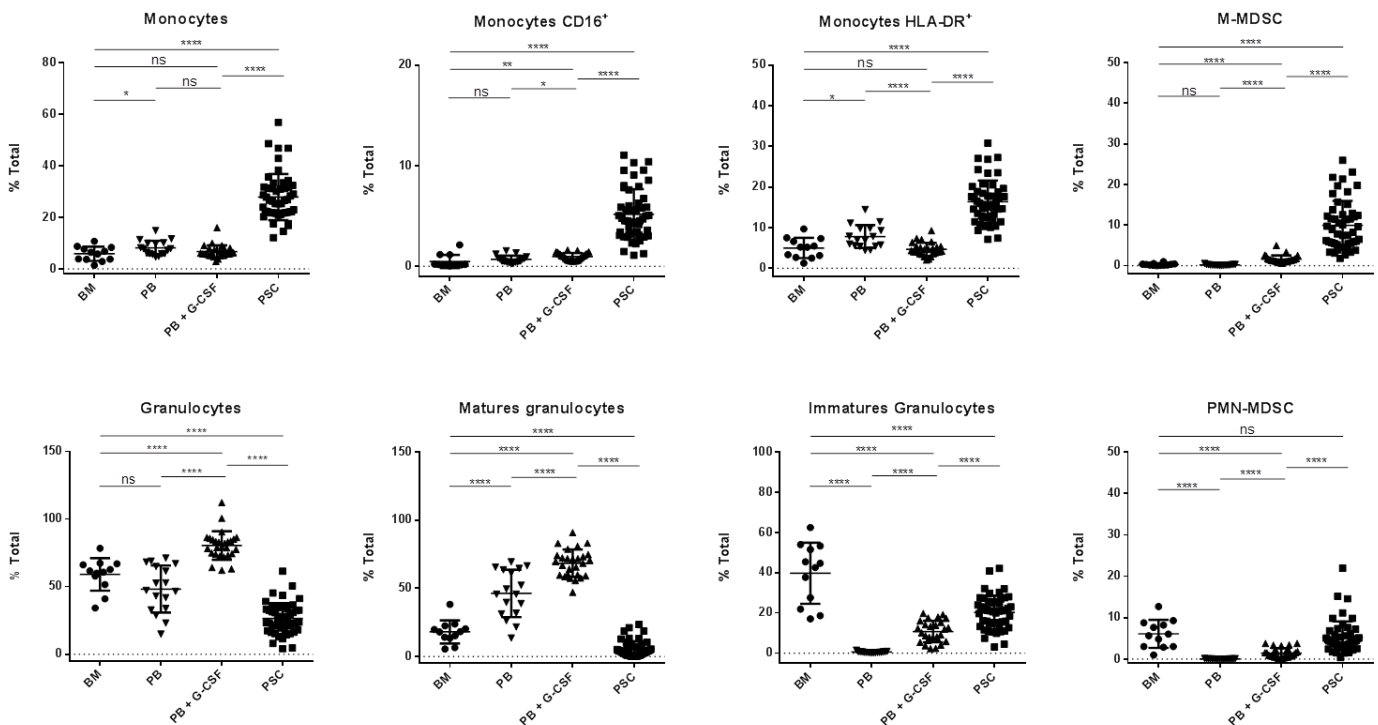


Figure 28 : Comparaison de la fréquence des populations monocytaires (en haut) et granulocytaires (en bas) dans les différents types d'échantillons analysés : la moelle osseuse (BM) (n=12), le sang avant (PB) (n=17) et après (PB+G-CSF) (n=27) traitement au G-CSF, et enfin le produit d'aphérèse, obtenu après traitement par G-CSF (n=50). Les graphes représentent le pourcentage parmi les CD45⁺ de chaque population dans les échantillons, avec la moyenne \pm écart-type, et la significativité statistique a été déterminée par le test de Student (****p<0,0001 ; **p<0,01 ; *p<0,05 ; ns : non significatif).

Afin de comprendre les différences de compositions en populations myéloïdes entre la moelle osseuse et le produit d'aphérèse, nous avons comparé tous les types d'échantillons, dans le but de savoir si une population est affectée plus qu'une autre par le traitement au G-CSF (**Figure 28**).

Nous avons observé que le pourcentage de monocytes présent dans le sang avant traitement au G-CSF n'est pas significativement augmenté après traitement (8,07% avant G-CSF et 6,65% après G-CSF). Le G-CSF ne modifie donc pas le pourcentage de monocytes en périphérie. En revanche, ce pourcentage dans le produit d'aphérèse est significativement

plus élevé que dans le sang après traitement (27,83% contre 6,65%, respectivement). Si nous regardons plus en détail les différentes populations monocytaires, nous observons la même chose pour les monocytes CD16⁺ et les monocytes HLA-DR⁺. En revanche, nous observons que la fréquence de M-MDSC présente dans la moelle osseuse n'est pas significativement différente que celle retrouvée dans le sang avant traitement au G-CSF (0,30% dans la moelle et 0,18% dans le sang non traité). Cependant, la fréquence de M-MDSC dans le sang après G-CSF est significativement plus élevée que dans la moelle (1,57% contre 0,30%, respectivement). Le G-CSF est donc capable d'induire des M-MDSC. Enfin, lorsque nous comparons le sang après traitement au G-CSF et le produit d'aphérèse, nous remarquons que ce dernier est nettement plus riche en M-MDSC (9,94% contre 1,57% dans le sang traité).

En ce qui concerne les populations granulocytaires, nous observons une augmentation significative de la fréquence des granulocytes totaux dans le sang après traitement au G-CSF, comparé au sang non traité ou à la moelle osseuse (80,38% dans le sang après G-CSF, 48,17% dans le sang avant G-CSF et 59,04% dans la moelle osseuse). Cependant, nous pouvons voir une diminution significative du pourcentage de granulocytes totaux après aphérèse (80,38% dans le sang après G-CSF contre 26,41% dans le produit d'aphérèse). Si nous regardons en détail les différentes populations granulocytaires, nous observons la même chose pour les granulocytes matures. En effet, nous pouvons voir une augmentation de leur fréquence dans le sang après G-CSF comparé au sang non traité et à la moelle osseuse (68,39% contre 46,23% et 17,96%, respectivement), ainsi qu'une nette diminution dans le produit d'aphérèse comparé au sang après traitement au G-CSF (5,48% contre 68,39%, respectivement). En revanche, si nous considérons les granulocytes immatures ainsi que les PMN-MDSC, nous observons que les pourcentages pour ces deux populations sont plus élevés dans le produit d'aphérèse comparé au sang après G-CSF (granulocytes immatures : 20,26% contre 10,75% ; PMN-MDSC : 5,21% contre 1,47%).

Les deux types de greffon, que sont la moelle osseuse et le produit d'aphérèse, diffèrent en termes de composition en population myéloïdes, ceci s'explique par la technique d'aphérèse qui concentre les cellules mononucléées, éliminant les populations granulocytaires.



III.3.4. Expression de PD-L1 dans les divers échantillons

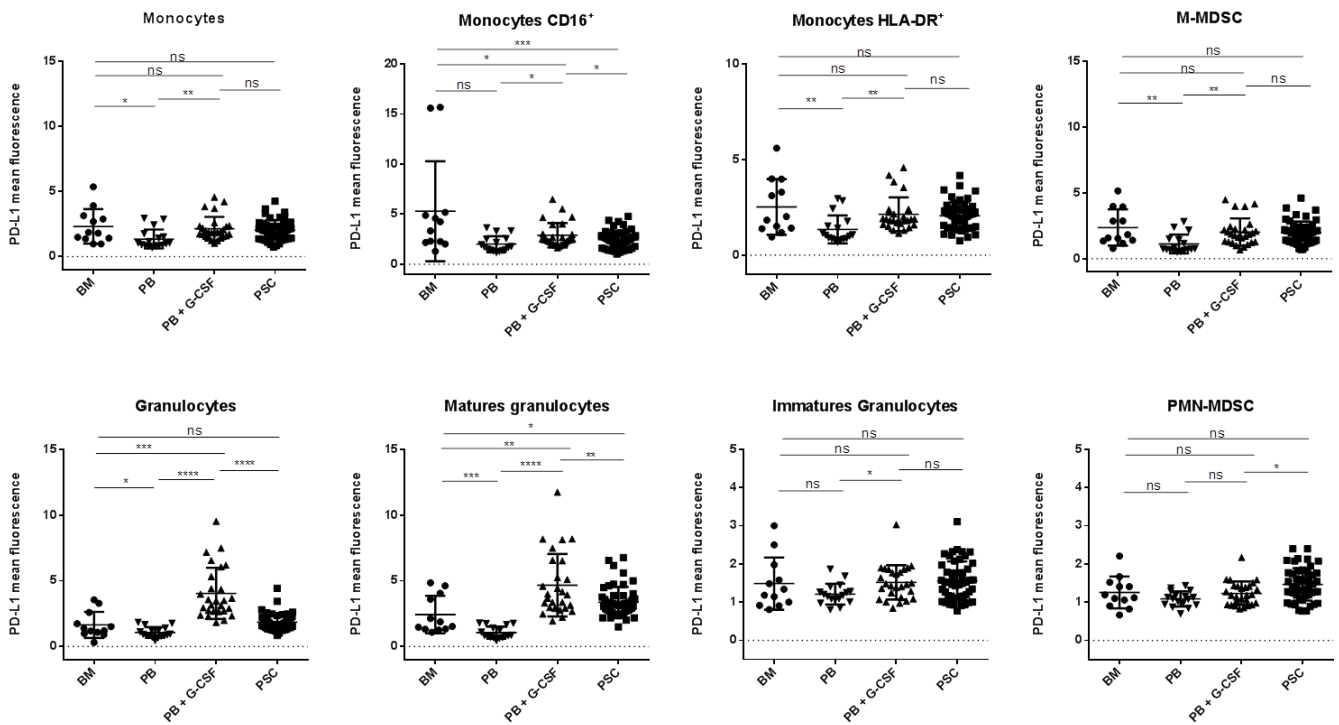


Figure 29 : Expression de PD-L1 par les populations monocytaires (en haut) et granulocytaires (en bas), dans les différents types d'échantillons analysés : la moelle osseuse (BM) (n=12), le sang avant (PB) (n=17) et après (PB+G-CSF) (n=27) traitement au G-CSF, et enfin le produit d'aphérèse, obtenu après traitement par G-CSF (n=50). Les graphes représentent la moyenne d'expression de PD-L1 sur chaque population dans les échantillons, avec la moyenne \pm écart-type, et la significativité statistique a été déterminée par le test de Student (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns : non significatif).

Afin de comprendre l'effet protecteur contre la GvHD grâce à la présence de MDSC dans le greffon, nous nous sommes intéressés à l'expression de PD-L1 par les populations myéloïdes étudiées jusque-là (**Figure 29**).

Nous avons observé que l'expression de PD-L1 sur les monocytes est augmentée dans le sang après traitement au G-CSF comparé au sang avant traitement (2,13 et 1,34 respectivement). En regardant les autres populations monocytaires en détail nous avons remarqué que cette observation est vraie pour les monocytes HLA-DR⁺ ainsi que pour les M-MDSC. L'expression de PD-L1 est significativement plus forte après traitement au G-CSF dans

le sang comparé au sang non traité (monocytes HLA-DR⁺ : 2,14 et 1,35 ; M-MDSC : 2,06 et 1,11). Pour ces mêmes populations, nous observons que l'expression de PD-L1 est semblable, puisque non significative, entre le sang après G-CSF et le produit d'aphérèse (monocytes : 2,13 et 2,03 respectivement ; monocytes HLA-DR⁺ : 2,14 et 2,06 respectivement ; M-MDSC : 2,06 et 1,96 respectivement).

Concernant les populations granulocytaires, nous avons pu voir que de la même façon que pour les monocytes, l'expression de PD-L1 est significativement plus forte dans le sang après traitement au G-CSF comparé au sang non traité (4,03 et 1,06 respectivement). Cette observation peut également être faite si nous regardons en détail les granulocytes matures et les granulocytes immatures (granulocytes matures : 4,66 dans le sang après traitement au G-CSF et 1,05 avant traitement au G-CSF ; granulocytes immatures : 1,56 après traitement au G-CSF et 1,21 avant traitement au G-CSF). Nous observons également que l'expression de PD-L1 est significativement diminuée dans le produit d'aphérèse comparé au sang après G-CSF pour les granulocytes matures (4,66 dans le sang après G-CSF et 3,37 dans le produit d'aphérèse), alors qu'elle est augmentée pour les PMN-MDSC (1,23 dans le sang après G-CSF et 1,47 dans le produit d'aphérèse). Enfin, nous remarquons qu'il n'y a pas de différence significative d'expression de PD-L1 entre les deux types de greffon (granulocytes : 1,64 et 1,85 ; granulocytes immatures : 1,49 et 1,56 ; PMN-MDSC : 1,25 et 1,47, dans la moelle et le produit d'aphérèse, respectivement), excepté pour les granulocytes matures, où l'expression de PD-L1 est significativement plus forte dans le produit d'aphérèse que dans la moelle osseuse (3,37 contre 2,42 respectivement).

Le G-CSF induit l'expression de PD-L1 à la fois sur les populations monocytaires et granulocytaires. Cependant, cette expression est globalement comparable entre les deux types de greffon, soit la moelle osseuse et le produit d'aphérèse.

III.4. Discussion et perspectives

Un traitement par G-CSF induit chez un donneur, la mobilisation des CSH de la moelle osseuse vers le sang (pour revue Tay *et al.*, 2017).

Tout d'abord, nous avons montré que le G-CSF permet de mobiliser dans le sang toutes les populations myéloïdes sans discrimination. Toutes les populations monocytaires



et granulocytaires sont augmentées dans le sang suite à un traitement par G-CSF, et ce, quel que soit le stade de maturité des cellules. En effet, nous observons que le nombre absolu de monocytes CD16⁺ est tout aussi augmenté que celui des M-MDSC. Les nombres absolus de granulocytes matures, de granulocytes immatures et de PMN-MDSC, sont tous affectés de façon similaire par un traitement au G-CSF. Les MDSC sont par conséquent mobilisées dans le sang par le G-CSF, au même titre que les cellules souches hématopoïétiques, soutenant les observations faites dans plusieurs études (Luyckx *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2015; Vendramin *et al.*, 2014). Par ailleurs, nous observons que les fréquences en M-MDSC et PMN-MDSC sont augmentées dans le sang, suite au traitement par G-CSF. Les MDSC sont donc plus nombreuses et plus fréquentes, signifiant que ces cellules sont mobilisées en grande quantité et au détriment d'autres populations leucocytaires, comme nous l'avons montré par exemple pour les monocytes (**Figure 26**).

Ensuite, nous avons voulu comparer les deux types de greffon, pouvant être proposés à un patient, dans le cadre de certains troubles hématologiques. Nous avons donc mis en évidence que la moelle osseuse et le produit d'aphérèse, obtenu après un traitement par G-CSF, diffèrent en termes de composition en cellules myéloïdes. Le produit d'aphérèse est significativement plus riche en monocytes comparé à la moelle osseuse, y compris en M-MDSC, qui sont à un stade plus immature. La moelle osseuse, quant à elle, est significativement plus riche en granulocytes matures et immatures comparée au produit d'aphérèse, qui n'a cependant plus de PMN-MDSC comparé à la moelle. La technique d'aphérèse permet en effet de concentrer les cellules mononucléées. Les monocytes mobilisés dans le sang suite à l'administration de G-CSF sont conservés, et les granulocytes, principalement les granulocytes matures, sont éliminés.

Comme décrit dans l'article, la stimulation *in vitro*, de cellules de moelle osseuse normale avec du G-CSF, montre une induction de M-MDSC. En effet, après 4 jours de culture en présence de G-CSF (40ng/mL), nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de M-MDSC, évoquant la capacité des cellules de la moelle osseuse à induire des M-MDSC sous l'effet du G-CSF. Cependant, au cours de ces expériences, cette cytokine n'a pas induit de PMN-MDSC.

Concernant l'expression de PD-L1, nous avons observé que suite à un traitement par G-CSF, ce marqueur était significativement plus exprimé dans le sang, à la fois sur les



populations monocytaires, mais également sur les granulocytes matures. Le G-CSF n'induit pas l'expression de PD-L1 sur les granulocytes à un stade plus immature et notamment sur les PMN-MDSC. Ces résultats sont contradictoires avec les observations que nous avons faites au cours des stimulations *in vitro* de moelles osseuses, présentées dans l'article. En effet, dans ces expériences, le G-CSF induit une augmentation significative de l'expression de PD-L1 uniquement par les PMN-MDSC, puisque le G-CSF n'a ici pas d'impact sur l'expression de ce marqueur sur les M-MDSC. Cependant, il est important de noter que l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC est comparable entre les échantillons de moelles osseuses et les produits d'aphérèse. Ceci signifie que malgré leurs différences de fréquence en MDSC, les deux types de greffon sont similaires en termes d'expression de ce marqueur d'immunosuppression. Les MDSC peuvent exercer leur activité immunosuppressive bénéfique contre la GvHD, grâce à des mécanismes autres que l'expression de PD-L1. Une étude chez des souris traitées au G-CSF a montré que les MDSC (CD11b⁺ Gr1⁺) mobilisées dans le sang pouvaient réduire la fréquence de GvHD via le mécanisme de l'IDO (Joo *et al.*, 2009).

Le G-CSF a pour effet, bien connu, de mobiliser les cellules souches hématopoïétiques dans le sang. Nous avons pu montrer grâce à cette étude, que toutes les populations myéloïdes (monocytaires et granulocytaires) à des stades de maturité différents, sont affectées par cette cytokine, et se retrouvent relarguées dans le sang. Cette myélopoïèse induite par le G-CSF peut nous faire penser à la myélopoïèse d'urgence, que nous observons dans le sepsis. Dans les deux conditions, nous avons pu observer une augmentation significative du nombre absolu de MDSC dans le sang, sans qu'il y ait toutefois une augmentation de l'expression de PD-L1. Dans ce contexte il serait intéressant de regarder en détail les autres populations myéloïdes dans le sepsis et d'étudier leurs comportements au cours de cette pathologie.

Dans le but de poursuivre cette étude, il serait aussi intéressant de considérer certaines données cliniques des receveurs. En effet, nous pouvons envisager de corrélérer la fréquence de MDSC avec la prise du greffon (traduite par la sortie d'aplasie), ou encore le développement, s'il existe, d'une GvHD. L'expression de PD-L1 à la surface des MDSC peut également être un élément important à détailler et relier à ces mêmes données cliniques.



Discussions, perspectives et conclusions

Au cours de ces travaux, nous avons soulevé la question d'une éventuelle origine médullaire des MDSC retrouvées dans le sepsis, ainsi qu'un rôle immunosuppresseur à long terme via l'expression du marqueur PD-L1. Nous avons ainsi réalisé différentes expérimentations, que ce soit *in vivo* avec l'analyse des échantillons de sang et de moelle osseuse de patients, et *in vitro* avec l'étude de l'effet de cytokines sur les cellules de moelle osseuse. Pour finir, la mise en relation de ces informations avec les données cliniques des patients, nous a permis de voir à long terme les conséquences de la présence des MDSC.

1. Origine médullaire

Dans notre étude, nous avons voulu mettre en évidence l'origine des MDSC dans le sepsis. Ces cellules, comme leur nom l'indique, ont une origine myéloïde, il était donc cohérent d'étudier en premier lieu la moelle osseuse comme source principale pour ces cellules. Grâce à l'analyse directe du phénotype des MDSC sur des prélèvements de moelle osseuse de patients septiques, nous avons observé une augmentation de la fréquence de ces cellules dans ce tissu, comparé à des moelles osseuses contrôles. La moelle osseuse produit donc de façon très rapide et en grande quantité, les MDSC que nous retrouvons dans le sang.

Cette observation rappelle la myélopoïèse d'urgence. Ce phénomène résume la libération massive et rapide de cellules myéloïdes par la moelle osseuse, avant d'être complètement matures, dans des conditions physiologiques particulières (administration clinique de G-CSF ou infection). Ce mécanisme survient en réponse à un signal inflammatoire, dans le but de remplacer les populations périphériques endommagées (Panopoulos and Watowich, 2008). Puisque nous savons que très tôt dans un sepsis, l'apoptose d'un grand nombre de types cellulaires, ainsi que de multiples bouleversements immunitaires se produisent, il est donc très probable que la moelle osseuse veuille rapidement compenser ces anomalies. Les MDSC sont donc produites parmi un ensemble de



populations immatures (granulocytes immatures par exemple) pour, dans un premier temps, combler la perte de cellules immunes en périphérie. Leurs capacités immunosuppressives sont à ce moment-là bénéfiques, et contiennent les dommages dus à l'inflammation au niveau de l'infection. Cependant, leurs activités inhibitrices, principalement sur les L_T , en font des cellules néfastes à long terme, puisqu'elles participent à l'état d'immunosuppression des patients.

Par ailleurs, pour confirmer les observations phénotypiques des MDSC dans la moelle osseuse des patients septiques, il serait bon de réaliser des tests de fonctionnalité avec ces cellules. En effet, nous pouvons seulement affirmer que nous observons des MDSC avec un phénotype correspondant, mais nous n'avons à ce jour aucune information concernant l'activité immunosuppressive de ces cellules sur des L_T , par exemple. Il est possible que ces MDSC présentes dans la moelle osseuse au jour 0, ne soient pas encore fonctionnelles, mais acquièrent en périphérie leurs capacités inhibitrices.

Il est aussi possible qu'il existe d'autres sources pour les MDSC. A l'image du microenvironnement tumoral, les MDSC pourraient être le fruit de la différenciation de monocytes et de neutrophiles au niveau du site d'infection. En effet, des études ont montré *in vitro*, que lors de certaines conditions inflammatoires (LPS), les monocytes acquièrent un phénotype suppressif (Pena *et al.*, 2011; Porta *et al.*, 2009). Nous pouvons imaginer qu'au cours d'un sepsis, ces monocytes anti-inflammatoires reprogrammés, présents sur le site de l'infection, se différencieraient en M-MDSC dans le but de limiter les effets dévastateurs de la réponse inflammatoire.

Concernant les PMN-MDSC, nous pouvons également penser que ces cellules sont issues de neutrophiles, qui ont aussi acquis des capacités immunosuppressives. Une étude a montré que les neutrophiles présents dans le microenvironnement tumoral peuvent acquérir un phénotype pro-tumoral sous l'influence de TGF- β (Fridlender *et al.*, 2009). Sous l'influence de certains facteurs, les cellules de l'immunité sont capables de modifier leur phénotype et d'acquérir un phénotype créant un environnement supprimeur. Granot et Fridlender, ont d'ailleurs émis une théorie, supportant cette idée : la théorie « *immunosuppressive switch* » des neutrophiles, selon laquelle les PMN-MDSC seraient des granulocytes activés. Nous pouvons donc imaginer, qu'une partie des PMN-MDSC retrouvés

dans le sepsis, sont des neutrophiles qui sous l'influence de signaux d'inflammation, développent un phénotype immunosuppresseur (Granot and Fridlender, 2015).

Pour affirmer ou infirmer ces hypothèses, il serait intéressant d'analyser le phénotype des cellules monocytaires et granulocytaires présentes au site d'infection. Pour cela, des modèles murins de sepsis ou une étude sur des biopsies de patients (élimination chirurgicale de la source d'infection), pourraient être mis en place.

2. MDSC dans le sepsis

Dans notre étude, nous avons suivi la fréquence de MDSC dans le sang au cours de l'hospitalisation de patients ayant une infection, à des gravités différentes. Grâce à l'étude du phénotype des cellules myéloïdes en périphérie, nous avons montré *ex vivo*, qu'au cours d'une infection, la quantité de MDSC est augmentée dès le jour d'hospitalisation, comparé à une population contrôle.

Nous avons pu observer que les M-MDSC et les PMN-MDSC ont une cinétique différente au cours du temps, mais également différente selon la sévérité de l'infection. Il apparaît ici très clairement, que la quantité de M-MDSC augmente dès le jour 0 et indifféremment de la gravité du patient. En revanche, au même moment, les PMN-MDSC ne sont augmentés que chez les patients les plus sévères (choc septique). Nous avons également noté que le pourcentage de M-MDSC dans le sang a une cinétique différente de celui des PMN-MDSC. Ces dernières augmentent en taille aux jours 3 et 7, alors que les M-MDSC ont une quantité constante au cours de l'hospitalisation. Ces observations soulèvent une question concernant le rôle de ces cellules. Si les M-MDSC sont présentes dans le sang dès le jour 0 et ce, quelle que soit la gravité, nous pouvons penser que leurs fonctions interviennent tôt au cours d'une infection : elles pourraient en effet être présentes dans le but de limiter l'inflammation. En revanche, les PMN-MDSC voient leur pourcentage augmenter au cours de l'hospitalisation ; nous laissant imaginer que leurs fonctions ne sont pas nécessaires dès le début de l'infection. Nous pouvons aussi nous interroger sur le relargage de ces cellules par la moelle. Comme nous l'avons montré les M-MDSC et PMN-MDSC sont présents dans la moelle osseuse dès le jour d'hospitalisation. Les M-MDSC sont donc libérées dans le sang très rapidement après leur production. En revanche, il semblerait



que les PMN-MDSC soient séquestrés plusieurs heures au sein de la moelle osseuse, avant d'être relargués dans le sang. Il est alors probable que les PMN-MDSC nécessitent d'autres signaux pour qu'elles soient mobilisées en périphérie. Ces signaux pourraient être présents de façon croissante, à l'image de la cinétique des PMN-MDSC dans le sang, tels que les DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) libérés par les tissus lésés, ou encore des chimiokines.

Lors de nos expérimentations, nous avons déterminé l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC dans le sang. Nous avons observé que l'expression de PD-L1 par les M-MDSC n'était pas augmentée chez les patients comparés aux volontaires sains. L'expression de PD-L1 par les PMN-MDSC n'est augmentée qu'au jour 0 et chez les patients les plus graves. Au cours de l'hospitalisation, l'expression de PD-L1 à la surface des M-MDSC et des PMN-MDSC des patients septiques, ne varie pas et est similaire à celle des contrôles. Du fait de l'augmentation en taille des populations de MDSC lors d'une infection, nous nous attendions à observer une augmentation de l'expression de PD-L1 par ces cellules. De façon surprenante, seule la quantité de MDSC augmente, signifiant que les MDSC produites au cours du sepsis n'expriment pas PD-L1. Nous pouvons alors nous interroger sur leurs activités inhibitrices. Nous avons montré lors d'expérimentations de co-culture, que ces cellules sont capables d'inhiber les L_T *in vitro*. Ces MDSC possèdent donc des capacités immunosuppressives, mais ne semblent pas recourir à l'axe PD-1 / PD-L1. Il est probable qu'elles utilisent d'autres mécanismes d'inhibitions, et notamment celui de l'ARG1. En effet, nous avons montré *in vitro*, que les L_T mis en culture en présence de MDSC, ont une diminution de l'expression du CD247 (CD3 ζ). Hors, il est connu que la L-arginine est un élément essentiel au maintien de la durée de la demi-vie de l'ARNm du CD247 (Rodriguez *et al.*, 2002). Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expérimentations de co-culture de MDSC et de L_T , en présence d'anticorps anti-PD-L1, et / ou en présence d'agents bloquant l'ARG1.

Au cours de cette étude, nous avons approfondi le rôle des MDSC dans le sepsis, et notamment dans la réactivation virale induite par l'immunosuppression se produisant au cours du sepsis. Nous nous sommes focalisés sur le Torque Teno Virus (TTV) dont la charge

virale est sensible au statut immunitaire des patients, et a été proposé comme biomarqueur de leur immunocompétence. Dans nos analyses, nous n'avons pas montré de corrélation entre la charge virale du TTV et la quantité de MDSC dans le sang. Les difficultés rencontrées quant à la positivité des patients pour le TTV, ainsi que le manque de donnée concernant ce virus, ne nous permettent pas de démontrer clairement le rôle des MDSC vis-à-vis du TTV. Il serait toutefois intéressant de voir à plus long terme la charge virale de ce virus, à 30 jours voire 80 jours. En effet, il a été montré lors d'une étude réalisée au laboratoire, que la charge virale du TTV chez des patients après une transplantation rénale, atteint son pic en moyenne 80 jours après transplantation (Kulifaj *et al.*, 2018). L'immunosuppression induite post-transplantation est différente de l'immunosuppression causée par les bouleversements immunitaires du sepsis. Cependant, la réactivation du TTV semble nécessiter du temps, et il est probable que 14 jours ne soient pas suffisants pour se rendre compte d'une éventuelle variation de la charge virale. Ainsi, nous pourrions corréliser la quantité de MDSC au jour 0 et la charge virale du TTV à 80 jours.

La charge virale du TTV est donc un outil informatif que nous pourrions utiliser dans le sepsis, cependant le manque d'informations sur ce virus, nous empêche d'interpréter correctement ces résultats. L'étude de l'ARNm du TTV nous informerai sur sa réplication, et notamment à quel moment au cours du sepsis elle se produit principalement. Ceci nous permettrait de connaître le moment le plus informatif pour utiliser le TTV en tant que biomarqueur. Enfin, une analyse approfondie des génotypes du TTV pourrait mettre en évidence une différence de sensibilité de certains génotypes face aux changements immunitaires dans le sepsis, qui pourrait ensuite être extrapolée à d'autres conditions pathologiques telles que la transplantation d'organe.

Enfin, pour compléter cette étude, nous avons corrélié la fréquence de MDSC avec la durée d'hospitalisation des patients. Plusieurs variables ont été testées, et nous avons montré que seule la fréquence de PMN-MDSC dans le sang au jour 0 est corrélée à une hospitalisation plus longue. La mise en évidence d'une valeur seuil, à partir de laquelle la fréquence de MDSC est prédictive d'une durée d'hospitalisation plus longue, serait intéressante, dans le but d'estimer à plus long terme l'impact des MDSC dans le sepsis. Par ailleurs, comprendre si la présence des MDSC est la cause ou la conséquence d'une

hospitalisation plus longue, aiderait à éclaircir la physiopathologie du sepsis, et donc améliorer la prise en charge des patients.

3. Effet du G-CSF

L'action du G-CSF passe par son récepteur le Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor (G-CSF-R). Suite à la liaison de son ligand, le G-CSF-R active une cascade de phosphorylations des protéines JAK et STAT. Cette signalisation intracellulaire implique des protéines telles que les PI3K, Akt et MAPK, et va initier la prolifération de précurseurs présents dans la moelle osseuse. Ce facteur de croissance est donc connu pour stimuler la moelle osseuse qui va générer des polynucléaires neutrophiles et pour libérer ces cellules dans le sang (Deotare *et al.*, 2015).

Dans nos études sur les donneurs de cellules souches hématopoïétiques, nous avons pu mettre en évidence que le G-CSF permet la mobilisation dans le sang d'un grand nombre de type cellulaires. En effet, suite à un traitement par G-CSF, nous retrouvons dans le sang des patients, une augmentation des populations myéloïdes monocytaires et granulocytaires.

En plus de son effet sur la production des cellules myéloïdes par la moelle osseuse, le G-CSF est connu pour stimuler les fonctions des polynucléaires neutrophiles matures (Metcalf, 1985). Une étude a montré que le G-CSF induit sur des lignées cellulaires de neutrophiles murins, la production de ROS (Zhu *et al.*, 2006). Par ailleurs, le G-CSF peut être produit suite à un *stimuli* inflammatoire tel que le TNF- α ou l'IL-1, mais également lorsque les macrophages et cellules endothéliales sont stimulées par du LPS (Panopoulos and Watowich, 2008).

Il est possible que le G-CSF soit une des premières cytokines, si ce n'est la première, de l'orage cytokinique. En effet, l'élévation très rapide du nombre de globules blancs dans le sang au cours d'un sepsis (myélopoïèse d'urgence) est une des manifestations cliniques qui définit la pathologie. Par ailleurs, nous avons pu également observer que le G-CSF est élevé chez un petit nombre de patients septiques. Il est donc possible que la libération massive de G-CSF dans le plasma de ces patients soit achevée et que nous soyons dans la phase décroissante, laissant place à d'autres cytokines comme l'IL-6 ou l'IL-8. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions mettre en place un modèle murin de sepsis, chez lequel nous



suivrons la concentration de G-CSF dès les premières heures du sepsis. De plus, cette hypothèse est partagée par Liu et son équipe dans le cadre du Syndrome de Fièvre Sévère avec Thrombocytopénie (SFST) (Liu *et al.*, 2017). Cette fièvre hémorragique est causée par un virus émergent dont les signes cliniques sont proches d'un sepsis, avec la survenue d'un orage cytokinique. Dans cette étude, la concentration en G-CSF est corrélée à la gravité et selon cette équipe, le G-CSF serait produit pour augmenter le nombre de leucocytes et ainsi mieux éliminer le pathogène.

En prenant en compte ces informations, nous pouvons donc imaginer l'impact du G-CSF dans le sepsis. Suite à l'agression des cellules endothéliales par un pathogène et à la reconnaissance de ce dernier par l'immunité innée (par les macrophages), une libération de G-CSF se produit dès les premières minutes. Ce facteur de croissance agit directement sur les précurseurs de la moelle osseuse et induit une myélopoïèse d'urgence. Dans un second temps, le G-CSF va avoir pour effet d'activer ces polynucléaires neutrophiles nouvellement mobilisés dans le sang, notamment d'acquérir la capacité à produire des ROS. Parmi ces cellules se trouvent les MDSC, dont l'une des activités principales passe par la production de ROS. Le pic de libération de G-CSF s'estompe, laissant place à l'immunosuppression induite par la présence des MDSC.

Le G-CSF n'a qu'un effet moindre sur l'expression de PD-L1 *in vitro*. En effet, lorsque nous avons stimulé des cellules de moelles osseuses avec des cytokines, l'expression de PD-L1 sur les M-MDSC n'est pas affectée par le G-CSF. Celui-ci induit toutefois une augmentation significative de l'expression de PD-L1 sur les PMN-MDSC. Ces observations sont aussi retrouvées dans le sang des patients septiques (augmentation de l'expression de PD-L1 sur les PMN-MDSC des patients en choc septique). De façon surprenante, ces résultats ne sont pas retrouvés chez les donneurs de cellules souches hématopoïétiques traités au G-CSF. Nous avons en effet pu observer une augmentation de l'expression de PD-L1 dans le sang à la surface des M-MDSC, et sur les granulocytes matures principalement. Chez les donneurs de cellules souches hématopoïétiques (CSH), le G-CSF est administré quotidiennement à des doses élevées. Cette posologie particulière peut expliquer la différence d'expression de PD-L1 lorsque nous comparons aux patients septiques, puisque l'orage cytokinique étant, chez ces derniers, transitoire. Nous pouvons également imaginer



que les taux sériques de G-CSF retrouvés chez les donneurs sont plus importants que chez les patients septiques, expliquant la différence d'expression de PD-L1. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de doser le G-CSF dans le sang des donneurs de CSH, qui pourra ensuite être comparé à celui retrouvé chez les patients septiques.



4. Conclusions

L'objectif de mon projet de thèse aura été de mettre en évidence l'origine des MDSC dans le sepsis, et de comprendre leurs rôles dans cette pathologie. Nous avons ainsi montré que ce soit *ex vivo* et *in vitro*, que sous l'influence de l'orage cytokinique, et notamment du G-CSF, la moelle osseuse produit des MDSC. Celles-ci sont capables d'inhiber les L_T en périphérie via différents mécanismes, et participent à l'immunosuppression, pouvant conduire à la réactivation de certains virus (**Figure 30**).

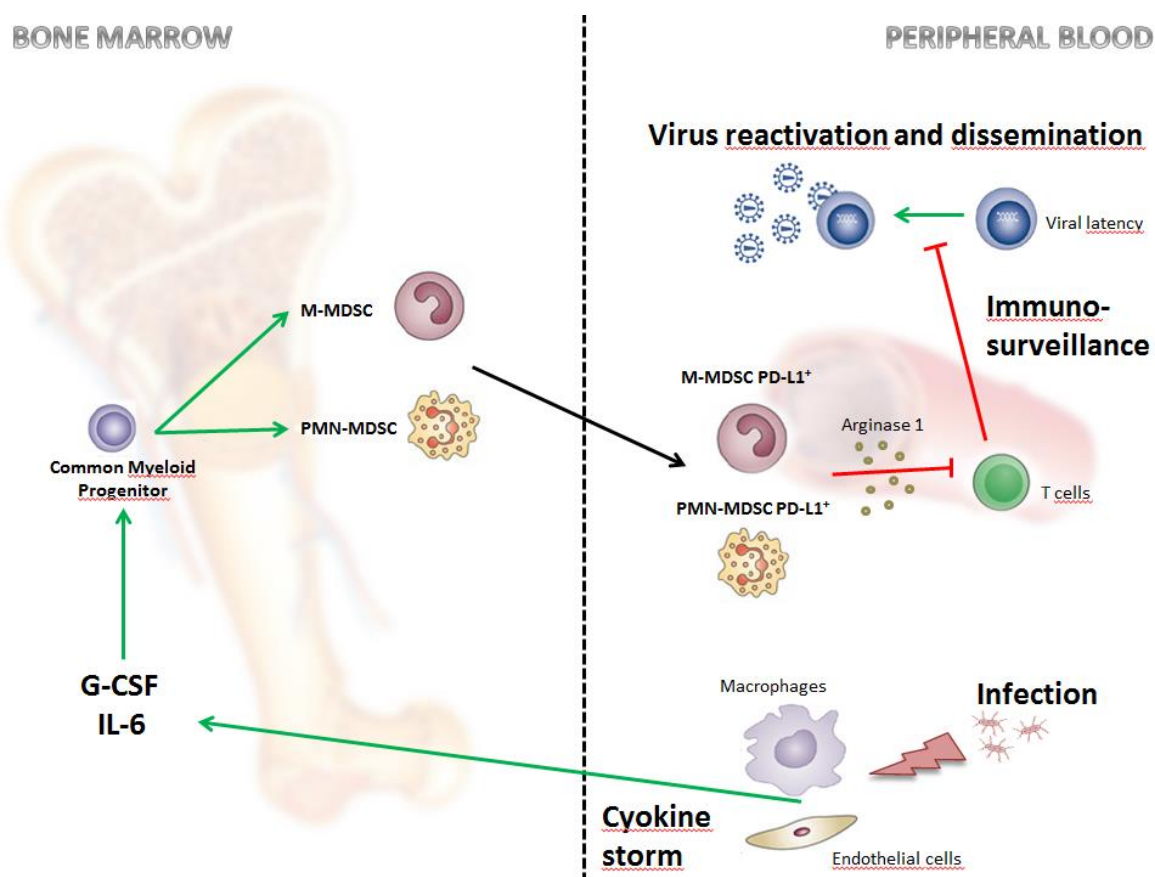


Figure 30 : Schéma récapitulatif de l'origine, du devenir et de l'impact des MDSC au cours du sepsis. Lors d'un sepsis, le G-CSF et l'IL-6 de l'orage cytokinique, agissent sur la moelle osseuse. Celle-ci produit alors des MDSC, qui une fois dans la circulation sanguine, sont capables d'inhiber les L_T participant ainsi à l'immunosuppression générale du sepsis, pouvant se traduire par la réactivation de certains virus.



Références bibliographiques

Abraham, E., Anzueto, A., Gutierrez, G., Tessler, S., San Pedro, G., Wunderink, R., Dal Nogare, A., Nasraway, S., Berman, S., Cooney, R., et al. (1998). Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet Lond. Engl.* *351*, 929–933.

Albert, E., Solano, C., Pascual, T., Torres, I., Macera, L., Focosi, D., Maggi, F., Giménez, E., Amat, P., and Navarro, D. (2017). Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *94*, 22–28.

Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L., and Mantovani, A. (1998). IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur. J. Immunol.* *28*, 359–369.

Angele, M.K., Pratschke, S., Hubbard, W.J., and Chaudry, I.H. (2014). Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* *5*, 12–19.

Annane, D., Aegerter, P., Jars-Guincestre, M.C., Guidet, B., and CUB-Réa Network (2003). Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *168*, 165–172.

Austermann, J., Zenker, S., and Roth, J. (2017). S100-alarmins: potential therapeutic targets for arthritis. *Expert Opin. Ther. Targets* *21*, 739–751.

Azzaoui, I., Uhel, F., Rossille, D., Pangault, C., Dulong, J., Le Priol, J., Lamy, T., Houot, R., Le Gouill, S., Cartron, G., et al. (2016). T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood* *128*, 1081–1092.

Ballbach, M., Dannert, A., Singh, A., Siegmund, D.M., Handgretinger, R., Piali, L., Rieber, N., and Hartl, D. (2017). Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells. *Immunol. Lett.* *192*, 1–6.

Bando, M., Ohno, S., Oshikawa, K., Takahashi, M., Okamoto, H., and Sugiyama, Y. (2001). Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Med.* *95*, 935–942.

Béland, K., Dore-Nguyen, M., Gagné, M.-J., Patey, N., Brassard, J., Alvarez, F., and Halac, U. (2014). Torque Teno virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. *J. Infect. Dis.* *209*, 247–254.

Bergenfelz, C., Medrek, C., Ekström, E., Jirström, K., Janols, H., Wullt, M., Bredberg, A., and Leandersson, K. (2012). Wnt5a Induces a Tolerogenic Phenotype of Macrophages in Sepsis and Breast Cancer Patients. *J. Immunol.* *188*, 5448–5458.

Biagini, P., and De Micco, P. (2010). The family Anelloviridae: Virus TTV and similar types.

Binsfeld, M., Muller, J., Lamour, V., De Veirman, K., De Raeve, H., Bellahcène, A., Van Valckenborgh, E., Baron, F., Beguin, Y., Caers, J., et al. (2016). Granulocytic myeloid-

derived suppressor cells promote angiogenesis in the context of multiple myeloma. *Oncotarget* 7, 37931–37943.

Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M.H., and Sibbald, W.J. (1992). Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *CHEST* 101, 1644–1655.

Boros, P., Ochando, J., and Zeher, M. (2016). Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity. *Hum. Immunol.* 77, 631–636.

Bozza, F.A., Salluh, J.I., Japiassu, A.M., Soares, M., Assis, E.F., Gomes, R.N., Bozza, M.T., Castro-Faria-Neto, H.C., and Bozza, P.T. (2007). Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit. Care* 11, R49.

Brandau, S., Dumitru, C.A., and Lang, S. (2013). Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin. Immunopathol.* 35, 163–176.

Bronte, V., Wang, M., Overwijk, W.W., Surman, D.R., Pericle, F., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (1998). Apoptotic Death of CD8+ T Lymphocytes After Immunization: Induction of a Suppressive Population of Mac-1+/Gr-1+ Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 5313–5320.

Bronte, V., Chappell, D.B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P., and Restifo, N.P. (1999). Unopposed Production of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Tumors Inhibits CD8+ T Cell Responses by Dysregulating Antigen-Presenting Cell Maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 5728–5737.

Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* 7, 12150.

Brown, K.A., Brain, S.D., Pearson, J.D., Edgeworth, J.D., Lewis, S.M., and Treacher, D.F. (2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet Lond. Engl.* 368, 157–169.

Brudecki, L., Ferguson, D.A., McCall, C.E., and El Gazzar, M. (2012). Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect. Immun.* 80, 2026–2034.

Bruger, A.M., Dorhoi, A., Esendagli, G., Barczyk-Kahlert, K., van der Bruggen, P., Lipoldova, M., Perecko, T., Santibanez, J., Saraiva, M., Van Ginderachter, J.A., et al. (2018). How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer Immunol. Immunother. CII.*

Brun-Buisson, C., Doyon, F., Carlet, J., Dellamonica, P., Gouin, F., Lepoutre, A., Mercier, J.C., Offenstadt, G., and Régnier, B. (1995). 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.

Buessow, S.C., Paul, R.D., Miller, A.M., and Lopez, D.M. (1984). Lymphoreticular cells isolated by centrifugal elutriation from a mammary adenocarcinoma. I. Characterization of an



in situ lymphocyte suppressor population by surface markers and functional reactivity. *Int. J. Cancer* 33, 79–85.

Busani, S., Damiani, E., Cavazzuti, I., Donati, A., and Girardis, M. (2016). Intravenous immunoglobulin in septic shock: review of the mechanisms of action and meta-analysis of the clinical effectiveness. *Minerva Anestesiol.* 82, 559–572.

Calcaterra, S., Zaniratti, M.S., Serraino, D., Peroni, M., Abbate, I., Cappiello, G., Piselli, P., Pavia, C., Rezza, G., Ippolito, G., et al. (2001). Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women. *J. Hum. Virol.* 4, 343–345.

Cavaillon, J.-M., and Adib-Conquy, M. (2006). Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 10, 233.

Cecconi, M., Evans, L., Levy, M., and Rhodes, A. (2018). Sepsis and septic shock. *Lancet Lond. Engl.* 392, 75–87.

Chang, K., Svabek, C., Vazquez-Guillamet, C., Sato, B., Rasche, D., Wilson, S., Robbins, P., Ulbrandt, N., Suzich, J., Green, J., et al. (2014). Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 18, R3.

Chang, K.C., Burnham, C.-A., Compton, S.M., Rasche, D.P., Mazuski, R.J., McDonough, J.S., Unsinger, J., Korman, A.J., Green, J.M., and Hotchkiss, R.S. (2013). Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, R85.

Charlton, M., Adjei, P., Poterucha, J., Zein, N., Moore, B., Therneau, T., Krom, R., and Wiesner, R. (1998). TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology. Baltim. Md* 28, 839–842.

Cheng, P., Corzo, C.A., Luetsteke, N., Yu, B., Nagaraj, S., Bui, M.M., Ortiz, M., Nacker, W., Sorg, C., Vogl, T., et al. (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J. Exp. Med.* 205, 2235–2249.

Chung, J.-Y., Han, T.H., Koo, J.W., Kim, S.W., Seo, J.K., and Hwang, E.S. (2007). Small anellovirus infections in Korean children. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 791–793.

Condamine, T., Mastio, J., and Gabrilovich, D.I. (2015). Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J. Leukoc. Biol.* 98, 913–922.

Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.-I., Cheng, P., Cho, H.-I., Celis, E., Quiceno, D.G., Padhya, T., et al. (2010). HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J. Exp. Med.* 207, 2439–2453.

da Costa, L.H.A., Júnior, N.N.D.S., Catalão, C.H.R., Sharshar, T., Chrétien, F., and da Rocha, M.J.A. (2017). Vasopressin Impairment During Sepsis Is Associated with Hypothalamic Intrinsic Apoptotic Pathway and Microglial Activation. *Mol. Neurobiol.* 54, 5526–5533.

Cummings, C.J., Martin, T.R., Frevert, C.W., Quan, J.M., Wong, V.A., Mongovin, S.M., Hagen, T.R., Steinberg, K.P., and Goodman, R.B. (1999). Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 162, 2341–2346.

Daix, T., Guerin, E., Tavernier, E., Mercier, E., Gissot, V., Héroult, O., Mira, J.-P., Dumas, F., Chapuis, N., Guitton, C., et al. (2018). Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest*.

Dan, C., Adriana Ion, D., Spandole-Dinu, S., Apostol, P., Mihai, T., Radu, I., Panduru, N., Belc, N., Berca, L.-M., Adascalului, M., et al. (2013). Potential implication of genetic polymorphisms and Torque teno virus in sporadic breast cancer.

Danai, P.A., Sinha, S., Moss, M., Haber, M.J., and Martin, G.S. (2007). Seasonal variation in the epidemiology of sepsis. *Crit. Care Med.* 35, 410–415.

Davidson, I., and Shulman, L.M. (2008). Unraveling the puzzle of human anellovirus infections by comparison with avian infections with the chicken anemia virus. *Virus Res.* 137, 1–15.

De Santo, C., Salio, M., Masri, S.H., Lee, L.Y.-H., Dong, T., Speak, A.O., Porubsky, S., Booth, S., Veerapen, N., Besra, G.S., et al. (2008). Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus–induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 118, 4036–4048.

De Vlaminck, I., Khush, K.K., Strehl, C., Kohli, B., Luikart, H., Neff, N.F., Okamoto, J., Snyder, T.M., Cornfield, D.N., Nicolls, M.R., et al. (2013). Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell* 155, 1178–1187.

Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K.M., O'Malley, K.A., Wynn, J.L., Antonenko, S., Al-Quran, S.Z., et al. (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J. Exp. Med.* 204, 1463–1474.

Deng, L.Y., Yang, Z.C., Gong, Y.L., Huang, G.T., Yin, S.P., Jiang, B., and Peng, Y.Z. (2016). [Therapeutic effect of phages on extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*-induced sepsis in mice]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin. J. Burns* 32, 523–528.

Deotare, U., Al-Dawsari, G., Couban, S., and Lipton, J.H. (2015). G-CSF-primed bone marrow as a source of stem cells for allografting: revisiting the concept. *Bone Marrow Transplant.* 50, 1150–1156.

Desai, M., Pal, R., Deshmukh, R., and Banker, D. (2005). Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. *J. Med. Virol.* 77, 136–143.

Deshane, J., Zmijewski, J.W., Luther, R., Gaggar, A., Deshane, R., Lai, J.-F., Xu, X., Spell, M., Estell, K., Weaver, C.T., et al. (2011). Free radical-producing myeloid-derived regulatory cells: potent activators and suppressors of lung inflammation and airway hyperresponsiveness. *Mucosal Immunol.* 4, 503–518.

Deshane, J.S., Redden, D.T., Zeng, M., Spell, M.L., Zmijewski, J.W., Anderson, J.T., Deshane, R.J., Gaggar, A., Siegal, G.P., Abraham, E., et al. (2015). Subsets of airway myeloid-derived regulatory cells distinguish mild asthma from chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 413–424.e15.

Diaz-Montero, C.M., Finke, J., and Montero, A.J. (2014). Myeloid-derived suppressor cells in cancer: therapeutic, predictive, and prognostic implications. *Semin. Oncol.* 41, 174–184.

- Draghiciu, O., Nijman, H.W., Hoogeboom, B.N., Meijerhof, T., and Daemen, T. (2015). Sunitinib depletes myeloid-derived suppressor cells and synergizes with a cancer vaccine to enhance antigen-specific immune responses and tumor eradication. *Oncoimmunology* 4.
- Drewry, A.M., Samra, N., Skrupky, L.P., Fuller, B.M., Compton, S.M., and Hotchkiss, R.S. (2014). Persistent Lymphopenia after Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality. *Shock* August 42, 383–391.
- Drujont, L., Carretero-Iglesia, L., Bouchet-Delbos, L., Beriou, G., Merieau, E., Hill, M., Delneste, Y., Cuturi, M.C., and Louvet, C. (2014). Evaluation of the Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cell (MDSC) Adoptive Transfer in Mouse Models of Autoimmunity and Allograft Rejection. *PLoS ONE* 9.
- Ebong, S., Call, D., Nemzek, J., Bolgos, G., Newcomb, D., and Remick, D. (1999). Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect. Immun.* 67, 6603–6610.
- Erensoy, S., Sayiner, A.A., Türkoğlu, S., Canatan, D., Akarca, U.S., Sertöz, R., Ozacar, T., Batur, Y., Badur, S., and Bilgiç, A. (2002). TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey. *Infection* 30, 299–302.
- Esposito, S., De Simone, G., Boccia, G., De Caro, F., and Pagliano, P. (2017). Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 10, 204–212.
- Fekete, S. (1968). [Sammelweis, Pasteur, Lister]. *Presse Med.* 76, 1083–1085.
- Feldmeyer, N., Wabnitz, G., Leicht, S., Luckner-Minden, C., Schiller, M., Franz, T., Conradi, R., Kropf, P., Müller, I., Ho, A.D., et al. (2012). Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T lymphocytes. *Int. Immunol.* 24, 303–313.
- Felmet, K.A., Hall, M.W., Clark, R.S.B., Jaffe, R., and Carcillo, J.A. (2005). Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 3765–3772.
- Ferris, R.L., Lu, B., and Kane, L.P. (2014). Too much of a good thing? Tim-3 and TCR signaling in T cell exhaustion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 1525–1530.
- Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N.K.J., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., Reinhart, K., and International Forum of Acute Care Trialists (2016). Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 259–272.
- Focosi, D., Macera, L., Pistello, M., and Maggi, F. (2014). Torque Teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *J. Infect. Dis.* 210, 667–668.
- Focosi, D., Macera, L., Boggi, U., Nelli, L.C., and Maggi, F. (2015). Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J. Gen. Virol.* 96, 115–117.
- Focosi, D., Antonelli, G., Pistello, M., and Maggi, F. (2016). Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 589–593.

Fogli, M., Torti, C., Malacarne, F., Fiorentini, S., Albani, M., Izzo, I., Giagulli, C., Maggi, F., Carosi, G., and Caruso, A. (2012). Emergence of exhausted B cells in asymptomatic HIV-1-infected patients naïve for HAART is related to reduced immune surveillance. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 829584.

Forel, J.-M., Chiche, L., Thomas, G., Mancini, J., Farnarier, C., Cognet, C., Guervilly, C., Daumas, A., Vély, F., Xéridat, F., et al. (2012). Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PloS One* 7, e50446.

Francois, B., Jeannet, R., Daix, T., Walton, A.H., Shotwell, M.S., Unsinger, J., Monneret, G., Rimmelé, T., Blood, T., Morre, M., et al. (2018). Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 3.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Cheng, G., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Bayuh, R., Worthen, G.S., et al. (2012). Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PloS One* 7, e31524.

Funk, D.J., Parrillo, J.E., and Kumar, A. (2009). Sepsis and Septic Shock: A History. *Crit. Care Clin.* 25, 83–101.

Gabitass, R.F., Annels, N.E., Stocken, D.D., Pandha, H.A., and Middleton, G.W. (2011). Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 60, 1419–1430.

Gabrilovich, D.I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol. Res.* 5, 3–8.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174.

Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92, 4150–4166.

Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., and Schreiber, H. (2007). The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67, 425–426.

Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 253–268.

Gama, L., Shirk, E.N., Russell, J.N., Carvalho, K.I., Li, M., Queen, S.E., Kalil, J., Zink, M.C., Clements, J.E., and Kallas, E.G. (2012). Expansion of a subset of CD14^{high}CD16^{neg}CCR2^{low}/neg monocytes functionally similar to myeloid-derived suppressor cells during SIV and HIV infection. *J. Leukoc. Biol.* 91, 803–816.

Gerlach, H. (2016). Agents to reduce cytokine storm. *F1000Research* 5.

Giamarellos-Bourboulis, E.J., Apostolidou, E., Lada, M., Perdios, I., Gatselis, N.K., Tsangaris, I., Georgitsi, M., Bristianou, M., Kanni, T., Sereti, K., et al. (2013). Kinetics of

circulating immunoglobulin M in sepsis: relationship with final outcome. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, R247.

Girotti, A.W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1, 87–95.

Goh, C., Narayanan, S., and Hahn, Y.S. (2013). Myeloid derived suppressor cells: The Dark Knight or The Joker in viral infections? *Immunol. Rev.* 255, 210–221.

Górski, A., Jończyk-Matysiak, E., Łusiak-Szelachowska, M., Międzybrodzki, R., Weber-Dąbrowska, B., and Borysowski, J. (2017). The Potential of Phage Therapy in Sepsis. *Front. Immunol.* 8.

Görzer, I., Haloschan, M., Jaksch, P., Klepetko, W., and Puchhammer-Stöckl, E. (2014). Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 33, 320–323.

Granot, Z., and Fridlender, Z.G. (2015). Plasticity beyond cancer cells and the “immunosuppressive switch.” *Cancer Res.* 75, 4441–4445.

Grimaldi, D., Louis, S., Pène, F., Sirgo, G., Rousseau, C., Claessens, Y.E., Vimeux, L., Cariou, A., Mira, J.P., Hosmalin, A., et al. (2011). Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 37, 1438–1446.

Guan, Q., Moreno, S., Qing, G., Weiss, C.R., Lu, L., Bernstein, C.N., Warrington, R.J., Ma, Y., and Peng, Z. (2013). The role and potential therapeutic application of myeloid-derived suppressor cells in TNBS-induced colitis. *J. Leukoc. Biol.* 94, 803–811.

Guérin, E., Orabona, M., Raquil, M.-A., Giraudeau, B., Bellier, R., Gibot, S., Béné, M.-C., Lacombe, F., Droin, N., Solary, E., et al. (2014). Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit. Care Med.* 42, 2007–2018.

Guignant, C., Lepape, A., Huang, X., Kherouf, H., Denis, L., Poitevin, F., Malcus, C., Chéron, A., Allaouchiche, B., Gueyffier, F., et al. (2011). Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 15, R99.

Guisset, O., Dilhuydy, M.-S., Thiébaud, R., Lefèvre, J., Camou, F., Sarrat, A., Gabinski, C., Moreau, J.-F., and Blanco, P. (2007). Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 33, 148–152.

Guo, C., Hu, F., Yi, H., Feng, Z., Li, C., Shi, L., Li, Y., Liu, H., Yu, X., Wang, H., et al. (2016). Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 278–285.

Haile, L.A., von Wasielewski, R., Gamrekashvili, J., Krüger, C., Bachmann, O., Westendorf, A.M., Buer, J., Liblau, R., Manns, M.P., Korangy, F., et al. (2008). Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* 135, 871–881, 881.e1-5.

Hanson, E.M., Clements, V.K., Sinha, P., Ilkovitch, D., and Ostrand-Rosenberg, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 937–944.

He, X.-L., Liao, X.-L., Xie, Z.-C., Han, L., Yang, X.-L., and Kang, Y. (2016). Pulmonary Infection Is an Independent Risk Factor for Long-Term Mortality and Quality of Life for Sepsis Patients. *BioMed Res. Int.* 2016.

Hestdal, K., Ruscetti, F.W., Ihle, J.N., Jacobsen, S.E., Dubois, C.M., Kopp, W.C., Longo, D.L., and Keller, J.R. (1991). Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J. Immunol.* 147, 22–28.

Highfill, S.L., Rodriguez, P.C., Zhou, Q., Goetz, C.A., Koehn, B.H., Veenstra, R., Taylor, P.A., Panoskaltis-Mortari, A., Serody, J.S., Munn, D.H., et al. (2010). Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 116, 5738–5747.

Hoechst, B., Ormandy, L.A., Ballmaier, M., Lehner, F., Krüger, C., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2008). A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 135, 234–243.

Hoechst, B., Voigtlaender, T., Ormandy, L., Gamrekelashvili, J., Zhao, F., Wedemeyer, H., Lehner, F., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2009). Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the Nkp30 receptor. *Hepatology* 50, 799–807.

Hoechst, B., Gamrekelashvili, J., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2011). Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood* 117, 6532–6541.

Hood, J.L., San, R.S., and Wickline, S.A. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 71, 3792–3801.

Hotchkiss, R.S., and Moldawer, L.L. (2014). Parallels between cancer and infectious disease. *N. Engl. J. Med.* 371, 380–383.

Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E., Chang, K.C., Cobb, J.P., Buchman, T.G., Korsmeyer, S.J., and Karl, I.E. (1999a). Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14541–14546.

Hotchkiss, R.S., Swanson, P.E., Freeman, B.D., Tinsley, K.W., Cobb, J.P., Matuschak, G.M., Buchman, T.G., and Karl, I.E. (1999b). Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* 27, 1230–1251.

Hotchkiss, R.S., Schmiege, R.E., Swanson, P.E., Freeman, B.D., Tinsley, K.W., Cobb, J.P., Karl, I.E., and Buchman, T.G. (2000). Rapid onset of intestinal epithelial and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and shock. *Crit. Care Med.* 28, 3207–3217.

Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E., Schmiege, R.E., Hui, J.J., Chang, K.C., Osborne, D.F., Freeman, B.D., Cobb, J.P., Buchman, T.G., et al. (2001). Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J. Immunol. Baltimore, Md* 166, 6952–6963.

Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 862–874.

Hotchkiss, R.S., Moldawer, L.L., Opal, S.M., Reinhart, K., Turnbull, I.R., and Vincent, J.-L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16045.



- Howell, M.D., Talmor, D., Schuetz, P., Hunziker, S., Jones, A.E., and Shapiro, N.I. (2011). Proof of principle: the predisposition, infection, response, organ failure sepsis staging system. *Crit. Care Med.* 39, 322–327.
- Huang, A., Zhang, B., Wang, B., Zhang, F., Fan, K.-X., and Guo, Y.-J. (2013). Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 62, 1439–1451.
- Huang, A., Zhang, B., Yan, W., Wang, B., Wei, H., Zhang, F., Wu, L., Fan, K., and Guo, Y. (2014a). Myeloid-derived suppressor cells regulate immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection through PD-1-induced IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 5461–5469.
- Huang, L.Y., Oystein Jonassen, T., Hungnes, O., and Grinde, B. (2001). High prevalence of TT virus-related DNA (90%) and diverse viral genotypes in Norwegian blood donors. *J. Med. Virol.* 64, 381–386.
- Huang, X., Chen, Y., Chung, C.-S., Yuan, Z., Monaghan, S.F., Wang, F., and Ayala, A. (2014b). Identification of B7-H1 as a novel mediator of the innate immune/proinflammatory response as well as a possible myeloid cell prognostic biomarker in sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 1091–1099.
- Huang, Y.H., Wu, J.C., Chiang, T.Y., Chan, Y.J., Huo, T.I., Huang, Y.S., Hwang, S.J., Chang, F.Y., and Lee, S.D. (2000). Detection and viral nucleotide sequence analysis of transfusion-transmitted virus infection in acute fulminant and non-fulminant hepatitis. *J. Viral Hepat.* 7, 56–63.
- Hubbard, W.J., Choudhry, M., Schwacha, M.G., Kerby, J.D., Rue, L.W., Bland, K.I., and Chaudry, I.H. (2005). Cecal ligation and puncture. *Shock Augusta Ga* 24 *Suppl 1*, 52–57.
- Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I., et al. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 355, 1428–1433.
- Inoue, S., Unsinger, J., Davis, C.G., Muenzer, J.T., Ferguson, T.A., Chang, K., Osborne, D.F., Clark, A.T., Coopersmith, C.M., McDunn, J.E., et al. (2010). IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 1401–1409.
- Itoh, Y., Takahashi, M., Fukuda, M., Shibayama, T., Ishikawa, T., Tsuda, F., Tanaka, T., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (2000). Visualization of TT Virus Particles Recovered from the Sera and Feces of Infected Humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 718–724.
- Iwata, T., Kondo, Y., Kimura, O., Morosawa, T., Fujisaka, Y., Umetsu, T., Kogure, T., Inoue, J., Nakagome, Y., and Shimosegawa, T. (2016). PD-L1+MDSCs are increased in HCC patients and induced by soluble factor in the tumor microenvironment. *Sci. Rep.* 6, 39296.
- Jacobsen, L.C., Theilgaard-Mönch, K., Christensen, E.I., and Borregaard, N. (2007). Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. *Blood* 109, 3084–3087.
- Janols, H., Bergenfelz, C., Allaoui, R., Larsson, A.-M., Rydén, L., Björnsson, S., Janciauskiene, S., Wullt, M., Bredberg, A., and Leandersson, K. (2014). A high frequency of

MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J. Leukoc. Biol.* 96, 685–693.

Jiao, Z., Hua, S., Wang, W., Wang, H., Gao, J., and Wang, X. (2013). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlated negatively with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 42, 85–90.

de Jong, E., van Oers, J.A., Beishuizen, A., Vos, P., Vermeijden, W.J., Haas, L.E., Loef, B.G., Dormans, T., van Melsen, G.C., Kluiters, Y.C., et al. (2016). Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect. Dis.* 16, 819–827.

Joo, Y.-D., Lee, S.-M., Lee, S.-W., Lee, W.-S., Lee, S.-M., Park, J.-K., Choi, I.-W., Park, S.-G., Choi, I., and Seo, S.-K. (2009). Granulocyte colony-stimulating factor-induced immature myeloid cells inhibit acute graft-versus-host disease lethality through an indoleamine dioxygenase-independent mechanism. *Immunology* 128, e632–e640.

Jorgensen, I., Rayamajhi, M., and Miao, E.A. (2017). Programmed cell death as a defence against infection. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 151–164.

Kadayifci, A., Guney, C., Uygun, A., Kubar, A., Bagci, S., and Dagalp, K. (2001). Similar frequency of TT virus infection in patients with liver enzyme elevations and healthy subjects. *Int. J. Clin. Pract.* 55, 434–436.

Kaukonen, K.-M., Bailey, M., Pilcher, D., Cooper, D.J., and Bellomo, R. (2015). Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N. Engl. J. Med.* 372, 1629–1638.

Kelly-Scumpia, K.M., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Delano, M.J., Cuenca, A.G., Nacionales, D.C., Wynn, J.L., Lee, P.Y., Kumagai, Y., Efron, P.A., et al. (2011). B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *J. Exp. Med.* 208, 1673–1682.

Kim, C.H. (2010). Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J. Blood Med.* 1, 13–19.

Kincaid, R.P., Burke, J.M., Cox, J.C., de Villiers, E.-M., and Sullivan, C.S. (2013). A human torque teno virus encodes a microRNA that inhibits interferon signaling. *PLoS Pathog.* 9, e1003818.

Klemke, M., Wabnitz, G.H., Funke, F., Funk, B., Kirchgessner, H., and Samstag, Y. (2008). Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity* 29, 404–413.

Knaul, J.K., Jörg, S., Oberbeck-Mueller, D., Heinemann, E., Scheuermann, L., Brinkmann, V., Mollenkopf, H.-J., Yeremeev, V., Kaufmann, S.H.E., and Dorhoi, A. (2014). Lung-Residing Myeloid-derived Suppressors Display Dual Functionality in Murine Pulmonary Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 1053–1066.

Ko, J.S., Zea, A.H., Rini, B.I., Ireland, J.L., Elson, P., Cohen, P., Golshayan, A., Rayman, P.A., Wood, L., Garcia, J., et al. (2009). Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 2148–2157.



- Kujawski, M., Kortylewski, M., Lee, H., Herrmann, A., Kay, H., and Yu, H. (2008). Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 3367–3377.
- Kulifaj, D., Durgueil-Lariviere, B., Meynier, F., Munteanu, E., Pichon, N., Dubé, M., Joannes, M., Essig, M., Hantz, S., Barranger, C., et al. (2018). Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *105*, 118–127.
- Kusmartsev, S., and Gabrilovich, D.I. (2006). Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *25*, 323–331.
- Kusmartsev, S., Cheng, F., Yu, B., Nefedova, Y., Sotomayor, E., Lush, R., and Gabrilovich, D. (2003). All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res.* *63*, 4441–4449.
- Kusmartsev, S., Nagaraj, S., and Gabrilovich, D.I. (2005). Tumor associated CD8+ T-cell tolerance induced by bone marrow derived immature myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 4583–4592.
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 181–189.
- Landelle, C., Lepape, A., Voirin, N., Tognet, E., Venet, F., Bohé, J., Vanhems, P., and Monneret, G. (2010). Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* *36*, 1859–1866.
- Lappat, E.J., and Cawein, M. (1964). A STUDY OF THE LEUKEMOID RESPONSE TO TRANSPLANTABLE A-280 TUMOR IN MICE. *Cancer Res.* *24*, 302–311.
- Le Tulzo, Y., Pangault, C., Gacouin, A., Guilloux, V., Tribut, O., Amiot, L., Tattevin, P., Thomas, R., Fauchet, R., and Drénou, B. (2002). Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock Augusta Ga* *18*, 487–494.
- Lee, M.Y., and Rosse, C. (1982). Depletion of lymphocyte subpopulations in primary and secondary lymphoid organs of mice by a transplanted granulocytosis-inducing mammary carcinoma. *Cancer Res.* *42*, 1255–1260.
- Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., and Smith, D.B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* *46*, D708–D717.
- Lekstrom-Himes, J.A., and Gallin, J.I. (2000). Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1703–1714.
- Levi, M., Schultz, M., and van der Poll, T. (2013). Sepsis and thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* *39*, 559–566.
- Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.-L., Ramsay, G., et al. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* *29*, 530–538.



Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 240–249.

Li, L., Zhang, T., Diao, W., Jin, F., Shi, L., Meng, J., Liu, H., Zhang, J., Zeng, C.-H., Zhang, M.-C., et al. (2015). Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Glucocorticoid-Mediated Amelioration of FSGS. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 26, 2183–2197.

Limagne, E., Euvrard, R., Thibaudin, M., Rébé, C., Derangère, V., Chevriaux, A., Boidot, R., Végran, F., Bonnefoy, N., Vincent, J., et al. (2016). Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX–Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer Res.* 76, 5241–5252.

Loftus, T.J., Mohr, A.M., and Moldawer, L.L. (2018). Dysregulated myelopoiesis and hematopoietic function following acute physiologic insult. *Curr. Opin. Hematol.* 25, 37–43.

López-Alcorocho, J.M., Mariscal, L.F., de Lucas, S., Rodríguez-Iñigo, E., Casqueiro, M., Castillo, I., Bartolomé, J., Herrero, M., Manzano, M.L., Pardo, M., et al. (2000). Presence of TTV DNA in serum, liver and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis. *J. Viral Hepat.* 7, 440–447.

Luo, L.-H., Li, D.-M., Wang, Y.-L., Wang, K., Gao, L.-X., Li, S., Yang, J.-G., Li, C.-L., Feng, W., and Guo, H. (2017). Tim3/galectin-9 alleviates the inflammation of TAO patients via suppressing Akt/NF-kB signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 491, 966–972.

Luyckx, A., Schoupe, E., Rutgeerts, O., Lenaerts, C., Fevery, S., Devos, T., Dierickx, D., Waer, M., Van Ginderachter, J.A., and Billiau, A.D. (2012). G-CSF stem cell mobilization in human donors induces polymorphonuclear and mononuclear myeloid-derived suppressor cells. *Clin. Immunol.* 143, 83–87.

Lv, M., Zhao, X.-S., Hu, Y., Chang, Y.-J., Zhao, X.-Y., Kong, Y., Zhang, X.-H., Xu, L.-P., Liu, K.-Y., and Huang, X.-J. (2015). Monocytic and promyelocytic myeloid-derived suppressor cells may contribute to G-CSF-induced immune tolerance in haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am. J. Hematol.* 90, E9–E16.

Maggi, F., and Bendinelli, M. (2009). Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 331, 65–90.

Maggi, F., Pifferi, M., Fornai, C., Andreoli, E., Tempestini, E., Vatteroni, M., Presciuttini, S., Marchi, S., Pietrobelli, A., Boner, A., et al. (2003). TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J. Virol.* 77, 2418–2425.

Maggi, F., Focosi, D., Albani, M., Lanini, L., Vatteroni, M.L., Petrini, M., Ceccherini-Nelli, L., Pistello, M., and Bendinelli, M. (2010). Role of Hematopoietic Cells in the Maintenance of Chronic Human Torquetenovirus Plasma Viremia. *J. Virol.* 84, 6891–6893.

Maggi, F., Pifferi, M., Michelucci, A., Albani, M., Sbranti, S., Lanini, L., Simi, P., Macchia, P., Pistello, M., and Bendinelli, M. (2011). Torque teno virus viremia load size in patients with selected congenital defects of innate immunity. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 18, 692–694.

Malmberg, K.J., Arulampalam, V., Ichihara, F., Petersson, M., Seki, K., Andersson, T., Lenkei, R., Masucci, G., Pettersson, S., and Kiessling, R. (2001). Inhibition of activated/memory (CD45RO(+)) T cells by oxidative stress associated with block of NF-kappaB activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 2595–2601.

Marigo, I., Bosio, E., Solito, S., Mesa, C., Fernandez, A., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Biciato, S., Falisi, E., et al. (2010). Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* 32, 790–802.

Marshall, J.C. (2014). Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol. Med.* 20, 195–203.

Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., and Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348, 1546–1554.

Martin, G.S., Mannino, D.M., and Moss, M. (2006). The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit. Care Med.* 34, 15–21.

Martínez, N.M., García, F., García, F., Alvarez, M., Bernal, M.C., Piédrola, G., Hernández, J., and Maroto, M.C. (2000). TT virus DNA in serum, peripheral blood mononuclear cells and semen of patients infected by HIV. *AIDS Lond. Engl.* 14, 1464–1466.

Martínez-Guinó, L., Ballester, M., Segalés, J., and Kekarainen, T. (2011). Expression profile and subcellular localization of Torque teno sus virus proteins. *J. Gen. Virol.* 92, 2446–2457.

Marvel, D., and Gabrilovich, D.I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J. Clin. Invest.* 125, 3356–3364.

Mathias, B., Delmas, A.L., Ozrazgat-Baslanti, T., Vanzant, E.L., Szpila, B.E., Mohr, A.M., Moore, F.A., Brakenridge, S.C., Brumback, B.A., Moldawer, L.L., et al. (2017). Human Myeloid-derived Suppressor Cells are Associated With Chronic Immune Suppression After Severe Sepsis/Septic Shock. *Ann. Surg.* 265, 827–834.

Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Kihana, T., Yano, M., Mori, T., and Onji, M. (2001). Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatol. Res.* 21, 280–287.

Meisel, C., Schefold, J.C., Pschowski, R., Baumann, T., Hetzger, K., Gregor, J., Weber-Carstens, S., Hasper, D., Keh, D., Zuckermann, H., et al. (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.

Meisner, M. (2014). Update on procalcitonin measurements. *Ann. Lab. Med.* 34, 263–273.

Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., and Bradfield, C.A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 3190–3198.

Miglietta, F., Faneschi, M.L., Lobreglio, G., Palumbo, C., Rizzo, A., Cucurachi, M., Portaccio, G., Guerra, F., and Pizzolante, M. (2015). Procalcitonin, C-reactive protein and serum lactate dehydrogenase in the diagnosis of bacterial sepsis, SIRS and systemic candidiasis. *Infez. Med. Riv. Period. Eziologia Epidemiol. Diagn. Clin. E Ter. Delle Patol. Infett.* 23, 230–237.

Millrud, C.R., Bergenfelz, C., and Leandersson, K. (2016). On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* 8, 3649–3665.

Mohr, A., Polz, J., Martin, E.M., Griessl, S., Kammler, A., Pötschke, C., Lechner, A., Bröker, B.M., Mostböck, S., and Männel, D.N. (2012). Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. *Eur. J. Immunol.* 42, 341–352.

Molon, B., Ugel, S., Del Pozzo, F., Soldani, C., Zilio, S., Avella, D., De Palma, A., Mauri, P., Monegal, A., Rescigno, M., et al. (2011). Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* 208, 1949–1962.

Monneret, G., Debard, A.-L., Venet, F., Bohe, J., Hequet, O., Bienvenu, J., and Lepape, A. (2003). Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit. Care Med.* 31, 2068–2071.

Monneret, G., Finck, M.-E., Venet, F., Debard, A.-L., Bohé, J., Bienvenu, J., and Lepape, A. (2004). The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol. Lett.* 95, 193–198.

Motallebnezhad, M., Jadidi-Niaragh, F., Qamsari, E.S., Bagheri, S., Gharibi, T., and Yousefi, M. (2016). The immunobiology of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37, 1387–1406.

Mougiakakos, D., Jitschin, R., von Bahr, L., Poschke, I., Gary, R., Sundberg, B., Gerbitz, A., Ljungman, P., and Le Blanc, K. (2013). Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/neg IDO+ myeloid cells in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 27, 377–388.

Movahedi, K., Guilliams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111, 4233–4244.

Munford, R.S., and Pugin, J. (2001). Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 316–321.

Narita, Y., Wakita, D., Ohkur, T., Chamoto, K., and Nishimura, T. (2009). Potential differentiation of tumor bearing mouse CD11b+Gr-1+ immature myeloid cells into both suppressor macrophages and immunostimulatory dendritic cells. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* 30, 7–15.

Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S.T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P.G., Leelahavanichkul, K., Koller, B.H., Brown, J.M., et al. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2—dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* 15, 42–49.

Nemzek, J.A., Hugunin, K.M., and Opp, M.R. (2008). Modeling Sepsis in the Laboratory: Merging Sound Science with Animal Well-Being. *Comp. Med.* 58, 120–128.

Nielsen, J.S., and McNagny, K.M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *J. Cell Sci.* 121, 3683–3692.

Ninomiya, M., Nishizawa, T., Takahashi, M., Lorenzo, F.R., Shimosegawa, T., and Okamoto, H. (2007). Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J. Gen. Virol.* 88, 1939–1944.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1997). A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 92–97.

Oberholzer, A., Oberholzer, C., and Moldawer, L.L. (2002). Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit. Care Med.* 30, S58-63.

Obermajer, N., Muthuswamy, R., Lesnock, J., Edwards, R.P., and Kalinski, P. (2011). Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118, 5498–5505.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology¹The nucleotide sequence data of the TTV isolate (TA278) reported in this paper will appear in the DDBJ, EMBL and GenBank nucleotide sequence databases with accession number AB008394.1. *Hepatol. Res.* 10, 1–16.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T., and Sugai, Y. (2000a). TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 700–707.

Okamoto, H., Ukita, M., Nishizawa, T., Kishimoto, J., Hoshi, Y., Mizuo, H., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (2000b). Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. *J. Virol.* 74, 5161–5167.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Asabe, S., Tsuda, F., and Yoshikawa, A. (2001). Heterogeneous Distribution of TT Virus of Distinct Genotypes in Multiple Tissues from Infected Humans. *Virology* 288, 358–368.

Okamura, A., Yoshioka, M., Kikuta, H., Kubota, M., Ma, X., Hayashi, A., Ishiko, H., and Kobayashi, K. (2000). Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *J. Med. Virol.* 62, 104–108.

Opal, S.M., Fisher, C.J., Dhainaut, J.F., Vincent, J.L., Brase, R., Lowry, S.F., Sadoff, J.C., Slotman, G.J., Levy, H., Balk, R.A., et al. (1997). 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.

Oseroff, A., Okada, S., and Strober, S. (1984). Natural suppressor (NS) cells found in the spleen of neonatal mice and adult mice given total lymphoid irradiation (TLI) express the null surface phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 132, 101–110.

Ost, M., Singh, A., Peschel, A., Mehling, R., Rieber, N., and Hartl, D. (2016). Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6.

Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 221–233.

Pan, P.-Y., Ma, G., Weber, K.J., Ozao-Choy, J., Wang, G., Yin, B., Divino, C.M., and Chen, S.-H. (2010). Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* 70, 99–108.

Panopoulos, A.D., and Watowich, S.S. (2008). GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR: MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION DURING STEADY STATE AND 'EMERGENCY' HEMATOPOIESIS. *Cytokine* 42, 277–288.

- Patera, A.C., Drewry, A.M., Chang, K., Beiter, E.R., Osborne, D., and Hotchkiss, R.S. (2016). 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.
- Patil, N.K., Bohannon, J.K., and Sherwood, E.R. (2016). Immunotherapy: A Promising Approach to Reverse Sepsis-Induced Immunosuppression. *Pharmacol. Res.* *111*, 688–702.
- Pena, O.M., Pistolic, J., Raj, D., Fjell, C.D., and Hancock, R.E.W. (2011). Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 7243–7254.
- Peng, D., Tanikawa, T., Li, W., Zhao, L., Vatan, L., Szeliga, W., Wan, S., Wei, S., Wang, Y., Liu, Y., et al. (2016). Myeloid-Derived Suppressor Cells Endow Stem-like Qualities to Breast Cancer Cells through IL6/STAT3 and NO/NOTCH Cross-talk Signaling. *Cancer Res.* *76*, 3156–3165.
- Pierre-A Piorry (1834). M. Piorry on Exploration of the Thoracic and Abdominal Organs, by Means of Percussion. *Medico-Chir. Rev.* *20*, 337–348.
- Pifferi, M., Maggi, F., Andreoli, E., Lanini, L., Marco, E.D., Fornai, C., Vatteroni, M.L., Pistello, M., Ragazzo, V., Macchia, P., et al. (2005). Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *J. Infect. Dis.* *192*, 1141–1148.
- Pifferi, M., Maggi, F., Caramella, D., De Marco, E., Andreoli, E., Meschi, S., Macchia, P., Bendinelli, M., and Boner, A.L. (2006). High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *25*, 804–808.
- Pillay, J., Tak, T., Kamp, V.M., and Koenderman, L. (2013). Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 3813–3827.
- Poehlmann, H., Schefold, J.C., Zuckermann-Becker, H., Volk, H.-D., and Meisel, C. (2009). Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit. Care Lond. Engl.* *13*, R119.
- Porta, C., Rimoldi, M., Raes, G., Brys, L., Ghezzi, P., Di Liberto, D., Dieli, F., Ghisletti, S., Natoli, G., De Baetselier, P., et al. (2009). Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14978–14983.
- Poschke, I., and Kiessling, R. (2012). On the armament and appearances of human myeloid-derived suppressor cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *144*, 250–268.
- Poschke, I., Mougiakakos, D., Hansson, J., Masucci, G.V., and Kiessling, R. (2010). Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Res.* *70*, 4335–4345.
- Prima, V., Kaliberova, L.N., Kaliberov, S., Curiel, D.T., and Kusmartsev, S. (2017). COX2/mPGES1/PGE2 pathway regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages and myeloid-derived suppressor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 1117–1122.
- Przerwa, A., Zimecki, M., Świtła-Jeleń, K., Dąbrowska, K., Krawczyk, E., Łuczak, M., Weber-Dąbrowska, B., Syper, D., Międzybrodzki, R., and Górski, A. (2006). Effects of

bacteriophages on free radical production and phagocytic functions. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 195, 143–150.

Qin, A., Cai, W., Pan, T., Wu, K., Yang, Q., Wang, N., Liu, Y., Yan, D., Hu, F., Guo, P., et al. (2013). Expansion of monocytic myeloid-derived suppressor cells dampens T cell function in HIV-1-seropositive individuals. *J. Virol.* 87, 1477–1490.

Qiu, P., Cui, X., Barochia, A., Li, Y., Natanson, C., and Eichacker, P.Q. (2011). The evolving experience with therapeutic TNF inhibition in sepsis: considering the potential influence of risk of death. *Expert Opin. Investig. Drugs* 20, 1555–1564.

Raith, E.P., Udy, A.A., Bailey, M., McGloughlin, S., Maclsaac, C., Bellomo, R., Pilcher, D.V., and Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Centre for Outcomes and Resource Evaluation (CORE) (2017). Prognostic Accuracy of the SOFA Score, SIRS Criteria, and qSOFA Score for In-Hospital Mortality Among Adults With Suspected Infection Admitted to the Intensive Care Unit. *JAMA* 317, 290–300.

Reinhart, K., Daniels, R., Kisson, N., Machado, F.R., Schachter, R.D., and Finfer, S. (2017). Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N. Engl. J. Med.* 377, 414–417.

Remick, D.G. (2007). Pathophysiology of Sepsis. *Am. J. Pathol.* 170, 1435–1444.

Remick, D.G., Newcomb, D.E., Bolgos, G.L., and Call, D.R. (2000). Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* August 13, 110–116.

Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W., Levy, M.M., Antonelli, M., Ferrer, R., Kumar, A., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., Nunnally, M.E., et al. (2017). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 43, 304–377.

Rieber, N., Singh, A., Öz, H., Carevic, M., Bouzani, M., Amich, J., Ost, M., Ye, Z., Ballbach, M., Schäfer, I., et al. (2015). Pathogenic fungi regulate immunity by inducing neutrophilic myeloid-derived suppressor cells. *Cell Host Microbe* 17, 507–514.

Rittirsch, D., Hoesel, L.M., and Ward, P.A. (2007). The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 81, 137–143.

Rittirsch, D., Huber-Lang, M.S., Flierl, M.A., and Ward, P.A. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* 4, 31–36.

Rocheteau, P., Chatre, L., Briand, D., Mebarki, M., Jouvion, G., Bardon, J., Crochemore, C., Serrani, P., Lecci, P.P., Latil, M., et al. (2015). Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. *Nat. Commun.* 6, 10145.

Rodríguez, P.C., and Ochoa, A.C. (2008). Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* 222, 180–191.

Rodriguez, P.C., Zea, A.H., Culotta, K.S., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., and Ochoa, A.C. (2002). Regulation of T Cell Receptor CD3 ζ Chain Expression by Arginine. *J. Biol. Chem.* 277, 21123–21129.



Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., and Ochoa, A.C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109, 1568–1573.

Root, R.K., Lodato, R.F., Patrick, W., Cade, J.F., Fotheringham, N., Milwee, S., Vincent, J.-L., Torres, A., Rello, J., Nelson, S., et al. (2003). 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.

Ross, R.S., Viazov, S., Runde, V., Schaefer, U.W., and Roggendorf, M. (1999). Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 13, 181–184.

Russo, R.C., Garcia, C.C., Teixeira, M.M., and Amaral, F.A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10, 593–619.

Safarzadeh, E., Orangi, M., Mohammadi, H., Babaie, F., and Baradaran, B. (2017). Myeloid-derived suppressor cells: Important contributors to tumor progression and metastasis. *J. Cell. Physiol.* n/a-n/a.

Sakula, A. (1979). Pierre Adolphe Piorry (1794-1879): pioneer of percussion and pleximetry. *Thorax* 34, 575–581.

Sander, L.E., Sackett, S.D., Dierssen, U., Beraza, N., Linke, R.P., Müller, M., Blander, J.M., Tacke, F., and Trautwein, C. (2010). Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.* 207, 1453–1464.

Schiemann, M., Puchhammer-Stöckl, E., Eskandary, F., Kohlbeck, P., Rasoul-Rockenschaub, S., Heilos, A., Kozakowski, N., Görzer, I., Kikić, Ž., Herkner, H., et al. (2017). Torque Teno Virus Load-Inverse Association With Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation* 101, 360–367.

Schultz, M.J., Dunser, M.W., Dondorp, A.M., Adhikari, N.K.J., Iyer, S., Kwizera, A., Lubell, Y., Papali, A., Pisani, L., Riviello, B.D., et al. (2017). Current challenges in the management of sepsis in ICUs in resource-poor settings and suggestions for the future. *Intensive Care Med.* 43, 612–624.

Scrimini, S., Pons, J., Agustí, A., Soriano, J.B., Cosio, B.G., Torrecilla, J.A., Núñez, B., Córdova, R., Iglesias, A., Jahn, A., et al. (2013). Differential effects of smoking and COPD upon circulating myeloid derived suppressor cells. *Respir. Med.* 107, 1895–1903.

Sendo, S., Saegusa, J., Okano, T., Takahashi, S., Akashi, K., and Morinobu, A. (2017). CD11b+Gr-1dim Tolerogenic Dendritic Cell-Like Cells Are Expanded in Interstitial Lung Disease in SKG Mice. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 69, 2314–2327.

Sevko, A., Michels, T., Vrohings, M., Umansky, L., Beckhove, P., Kato, M., Shurin, G.V., Shurin, M.R., and Umansky, V. (2013). Antitumor effect of paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 2464–2471.

Seymour, C.W., Liu, V.X., Iwashyna, T.J., Brunkhorst, F.M., Rea, T.D., Scherag, A., Rubenfeld, G., Kahn, J.M., Shankar-Hari, M., Singer, M., et al. (2016). Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. *JAMA* 315, 762–774.



Sharda, D.R., Yu, S., Ray, M., Squadrito, M.L., De Palma, M., Wynn, T.A., Morris, S.M., and Hankey, P.A. (2011). Regulation of macrophage arginase expression and tumor growth by the Ron receptor tyrosine kinase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 2181–2192.

Shibayama, T., Masuda, G., Ajisawa, A., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tsuda, F., and Okamoto, H. (2001). Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS Lond. Engl.* 15, 563–570.

Shime, H., Maruyama, A., Yoshida, S., Takeda, Y., Matsumoto, M., and Seya, T. (2017). Toll-like receptor 2 ligand and interferon- γ suppress anti-tumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 7.

Shindo, Y., McDonough, J.S., Chang, K.C., Ramachandra, M., Sasikumar, P.G., and Hotchkiss, R.S. (2017). Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *J. Surg. Res.* 208, 33–39.

Simonetta, F., Pradier, A., Masouridi-Levrat, S., van Delden, C., Giostra, E., Morard, I., Mueller, N., Muellhaupt, B., Valli, P.V., Semmo, N., et al. (2017). Torque Teno Virus Load and Acute Rejection After Orthotopic Liver Transplantation. *Transplantation* 101, e219–e221.

Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C.M., et al. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801–810.

Sleeman, J.P. (2012). The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 429–440.

Solito, S., Falisi, E., Diaz-Montero, C.M., Doni, A., Pinton, L., Rosato, A., Francescato, S., Basso, G., Zanovello, P., Onicescu, G., et al. (2011). A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118, 2254–2265.

Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Parlato, M., Philippart, F., Misset, B., Cavillon, J.-M., Adib-Conquy, M., and Captain study group (2012). Toll-like receptors expression and interferon- γ production by NK cells in human sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 16, R206.

Spandole, S., Cimponeriu, D., Berca, L.M., and Mihăescu, G. (2015). Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Arch. Virol.* 160, 893–908.

Spandole-Dinu, S., Tudor, A., Mariana Berca, L., Adascalului, M., Niculae, O., Cimponeriu, D., and Mihaescu, G. (2013). Torque teno viruses DNA found in meat products.

Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit T-Cell Activation by Depleting Cystine and Cysteine. *Cancer Res.* 70, 68–77.

Steven M. Opal (2009). The Evolution of the Understanding of Sepsis, Infection, and the Host Response: A Brief History. *Crit. Care Clin.* 25, 637–663.

Suarez De La Rica, A., Gilsanz, F., and Maseda, E. (2016). Epidemiologic trends of sepsis in western countries. *Ann. Transl. Med.* 4, 325.



Suzuki, K., Inoue, S., Kametani, Y., Komori, Y., Chiba, S., Sato, T., Inokuchi, S., and Ogura, S. (2016). Reduced Immunocompetent B Cells and Increased Secondary Infection in Elderly Patients With Severe Sepsis. *Shock Augusta Ga* 46, 270–278.

T. M. Therneau, and P. M. Grambsch (2000). *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model* | Terry M. Therneau | Springer.

Tacke, R.S., Lee, H.-C., Goh, C., Courtney, J., Polyak, S.J., Rosen, H.R., and Hahn, Y.S. (2012). Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species. *Hepatology. Baltim. Md* 55, 343–353.

Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M., and Mishiro, S. (2000). Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch. Virol.* 145, 979–993.

Takahashi, M., Asabe, S., Gotanda, Y., Kishimoto, J., Tsuda, F., and Okamoto, H. (2002). TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 242–248.

Takemura-Uchiyama, I., Uchiyama, J., Osanai, M., Morimoto, N., Asagiri, T., Ujihara, T., Daibata, M., Sugiura, T., and Matsuzaki, S. (2014). Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice. *Microbes Infect.* 16, 512–517.

Talmadge, J.E., and Gabrilovich, D.I. (2013). History of myeloid derived suppressor cells (MDSCs). *Nat. Rev. Cancer* 13, 739–752.

Talmadge, J.E., Uithoven, K.A., Lenz, B.F., and Chirigos, M. (1984). Immunomodulation and therapeutic characterization of thymosin fraction five. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 18, 185–194.

Tanaka, Y., Hayashi, J., Ariyama, I., Furusyo, N., Etoh, Y., and Kashiwagi, S. (2000). Seroepidemiology of TT virus infection and relationship between genotype and liver damage. *Dig. Dis. Sci.* 45, 2214–2220.

Tattevin, P., Monnier, D., Tribut, O., Dulong, J., Bescher, N., Mourcin, F., Uhel, F., Le Tulzo, Y., and Tarte, K. (2010). Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J. Infect. Dis.* 201, 956–966.

Tavazoie, M.F., Pollack, I., Tanquero, R., Ostendorf, B.N., Reis, B.S., Gonsalves, F.C., Kurth, I., Andreu-Agullo, C., Derbyshire, M.L., Posada, J., et al. (2018). LXR/ApoE Activation Restricts Innate Immune Suppression in Cancer. *Cell* 172, 825–840.e18.

Tay, J., Levesque, J.-P., and Winkler, I.G. (2017). Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche. *Int. J. Hematol.* 105, 129–140.

Thom, K., and Petrik, J. (2007). Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J. Med. Virol.* 79, 1–7.

Tjiu, J.-W., Chen, J.-S., Shun, C.-T., Lin, S.-J., Liao, Y.-H., Chu, C.-Y., Tsai, T.-F., Chiu, H.-C., Dai, Y.-S., Inoue, H., et al. (2009). Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1016–1025.



Toh, B., Wang, X., Keeble, J., Sim, W.J., Khoo, K., Wong, W.-C., Kato, M., Prevost-Blondel, A., Thiery, J.-P., and Abastado, J.-P. (2011). Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol.* 9, e1001162.

Toti, P., De Felice, C., Occhini, R., Schuerfeld, K., Stumpo, M., Epistolato, M.C., Vatti, R., and Buonocore, G. (2004). Spleen depletion in neonatal sepsis and chorioamnionitis. *Am. J. Clin. Pathol.* 122, 765–771.

Toussaint, S., and Gerlach, H. (2012). Immunoglobulins in adult sepsis and septic shock. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 14, 522–529.

Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E.A., Rickman, B., Betz, K.S., Penz, M., Bjorkdahl, O., Fox, J.G., et al. (2008). Overexpression of interleukin-1 β induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* 14, 408–419.

Uhel, F., Azzaoui, I., Grégoire, M., Pangault, C., Dulong, J., Tadié, J.-M., Gacouin, A., Camus, C., Cynober, L., Fest, T., et al. (2017). Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Septic Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*

Van Belleghem, J.D., Clement, F., Merabishvili, M., Lavigne, R., and Vanechoutte, M. (2017). Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* phages. *Sci. Rep.* 7.

Van Ginderachter, J.A., Beschin, A., De Baetselier, P., and Raes, G. (2010). Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. *Eur. J. Immunol.* 40, 2976–2985.

Vasilyev, E.V., Trofimov, D.Y., Tonevitsky, A.G., Ilinsky, V.V., Korostin, D.O., and Rebrikov, D.V. (2009). Torque Teno Virus (TTV) distribution in healthy Russian population. *Viol. J.* 6, 134.

Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* 19, 108–119.

Vendramin, A., Gimondi, S., Bermema, A., Longoni, P., Rizzitano, S., Corradini, P., and Carniti, C. (2014). Graft monocytic myeloid-derived suppressor cell content predicts the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 20, 2049–2055.

Venet, F., Chung, C.-S., Kherouf, H., Geeraert, A., Malcus, C., Poitevin, F., Bohé, J., Lepape, A., Ayala, A., and Monneret, G. (2009). Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 35, 678–686.

Venet, F., Davin, F., Guignant, C., Larue, A., Cazalis, M.-A., Darbon, R., Allombert, C., Mougin, B., Malcus, C., Poitevin-Later, F., et al. (2010). Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock Augusta Ga* 34, 358–363.

Venet, F., Foray, A.-P., Villars-Méchin, A., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Lepape, A., and Monneret, G. (2012). IL-7 Restores Lymphocyte Functions in Septic Patients. *J. Immunol.* 189, 5073–5081.



Venet, F., Filipe-Santos, O., Lepape, A., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Grives, A., Plantier, N., Pasqual, N., and Monneret, G. (2013). Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Crit. Care Med.* 41, 111–119.

de Villiers, E.M., Wagner, D., Schneider, A., Wesch, H., Miklaw, H., Wahrendorf, J., Papendick, U., and zur Hausen, H. (1987). Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet Lond. Engl.* 2, 703–706.

de Villiers, E.-M., Schmidt, R., Delius, H., and zur Hausen, H. (2002). Heterogeneity of TT virus related sequences isolated from human tumour biopsy specimens. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 80, 44–50.

Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M., and Thijs, L.G. (1996). 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.

Vincent, J.-L., Marshall, J.C., Namendys-Silva, S.A., François, B., Martin-Loeches, I., Lipman, J., Reinhart, K., Antonelli, M., Pickkers, P., Njimi, H., et al. (2014). Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir. Med.* 2, 380–386.

Vinodkumar, C.S., Kalsurmath, S., and Neelagund, Y.F. (2008). Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 51, 360–366.

Walton, A.H., Muenzer, J.T., Rasche, D., Boomer, J.S., Sato, B., Brownstein, B.H., Pachot, A., Brooks, T.L., Deych, E., Shannon, W.D., et al. (2014). Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PloS One* 9, e98819.

Wang, J.-F., Li, J.-B., Zhao, Y.-J., Yi, W.-J., Bian, J.-J., Wan, X.-J., Zhu, K.-M., and Deng, X.-M. (2015). 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. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* 122, 852–863.

Wang, L., Chang, E.W.Y., Wong, S.C., Ong, S.-M., Chong, D.Q.Y., and Ling, K.L. (2013). Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 794–804.

Wang, X., Teng, F., Kong, L., and Yu, J. (2016). PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets Ther.* 9, 5023–5039.

Ward, N.S., Casserly, B., and Ayala, A. (2008). The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients. *Clin. Chest Med.* 29, 617–viii.

Weber-Dbrowska, B., Mulczyk, M., and Górski, A. (2003). Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant. Proc.* 35, 1385–1386.

Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12, 492–499.

Whitfield-Larry, F., Felton, J., Buse, J., and Su, M.A. (2014). Myeloid-derived suppressor cells are increased in frequency but not maximally suppressive in peripheral blood of Type 1 Diabetes Mellitus patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 153, 156–164.



- Wichterman, K.A., Baue, A.E., and Chaudry, I.H. (1980). Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* 29, 189–201.
- Wu, T., Zhao, Y., Wang, H., Li, Y., Shao, L., Wang, R., Lu, J., Yang, Z., Wang, J., and Zhao, Y. (2016). mTOR masters monocytic myeloid-derived suppressor cells in mice with allografts or tumors. *Sci. Rep.* 6, 20250.
- Xiao, W., Klement, J.D., Lu, C., Ibrahim, M.L., and Liu, K. (2018). IFNAR1 Controls Autocrine Type I IFN Regulation of PD-L1 Expression in Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J. Immunol.* 201, 264–277.
- Yazici, M., Cömert, M.R., Mas, R., Guney, C., Cinar, E., and Kocar, I.H. (2002). Transfusion-transmitted virus prevalence in subjects at high risk of sexually transmitted infection in Turkey. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 363–367.
- Yin, Z., Li, C., Wang, J., and Xue, L. (2018). Myeloid-derived suppressor cell: Roles in the tumor microenvironment and tumor radiotherapy. *Int. J. Cancer.*
- Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabilovich, D.I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 5791–5802.
- Youn, J.-I., Collazo, M., Shalova, I.N., Biswas, S.K., and Gabilovich, D.I. (2012). Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol.* 91, 167–181.
- Young, M.R., Wright, M.A., Coogan, M., Young, M.E., and Bagash, J. (1992). Tumor-derived cytokines induce bone marrow suppressor cells that mediate immunosuppression through transforming growth factor beta. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 35, 14–18.
- Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., Yu, W., Shen, C., Liu, J., and Ren, X. (2013). Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 3783–3797.
- Zhang, H., Huang, Y., Wang, S., Fu, R., Guo, C., Wang, H., Zhao, J., Gaskin, F., Chen, J., Yang, N., et al. (2015). Myeloid-derived suppressor cells contribute to bone erosion in collagen-induced arthritis by differentiating to osteoclasts. *J. Autoimmun.* 65, 82–89.
- Zhang, Y., Zhang, M., Li, X., Tang, Z., He, L., and Lv, K. (2017). Expansion of CD11b+Ly-6C+ myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) driven by galectin-9 attenuates CVB3-induced myocarditis. *Mol. Immunol.* 83, 62–71.
- Zhao, Y., Wu, T., Shao, S., Shi, B., and Zhao, Y. (2015). Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 5.
- Zheng, H., Ye, L., Fang, X., Li, B., Wang, Y., Xiang, X., Kong, L., Wang, W., Zeng, Y., Ye, L., et al. (2007). Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with IkappaB kinases. *J. Virol.* 81, 11917–11924.
- Zhong, S., Yeo, W., Lin, C.K., Lin, X.R., Tang, M.W., and Johnson, P.J. (2001a). Quantitative and genotypic analysis of TT virus infection in Chinese blood donors. *Transfusion (Paris)* 41, 1001–1007.
- Zhong, S., Yeo, W., Tang, M.W., Lin, X.R., Mo, F., Ho, W.M., Hui, P., and Johnson, P.J. (2001b). Gross elevation of TT virus genome load in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 945, 84–92.

Zimmerman, J.E., Kramer, A.A., and Knaus, W.A. (2013). Changes in hospital mortality for United States intensive care unit admissions from 1988 to 2012. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, R81.

(2015). Remplissage vasculaire au cours des hypovolémies relatives ou absolues - La SFAR.

Table des illustrations

Figure 1 : Histoire de la découverte et de l'étude des MDSC (Talmadge and Gabrilovich, 2013).....	18
Figure 2 : Vue d'ensemble des théories sur l'origine des MDSC (Millrud et al., 2016).	21
Figure 3 : Modèle de régulation de l'expression de PD-L1 par les MDSC dans le microenvironnement tumoral (modifié d'après Xiao et al., 2018).....	28
Figure 4 : Mécanismes d'inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T utilisées par les MDSC (Gabrilovich et al., 2012).....	29
Figure 5 : La différenciation des MDSC régulée par différents signaux (modifié d'après Condamine et al., 2015; Yin et al., 2018).	31
Figure 6 : Les rôles pro-tumoraux associés aux MDSC dans les cancers solides (Talmadge and Gabrilovich, 2013)	35
Figure 7 : Guide d'identification des critères cliniques des patients septiques (modifié d'après Singer et al., 2016).....	47
Figure 8 : Récepteurs de surface et intracellulaire responsables de la reconnaissance de pathogènes et de signaux de dangers endogènes (Hotchkiss et al., 2016).	51
Figure 9 : Schéma simplifié de la régulation des interactions entre le système immunitaire inné, et le système immunitaire adaptatif (Gerlach, 2016).	52
Figure 10 : Modèle actuel des conséquences cliniques possibles au cours du sepsis (modifié d'après Hotchkiss et al., 2016).	55
Figure 11 : Localisation anatomique de la CLP chez la souris (modifié d'après Rittirsch et al., 2009).....	57
Figure 12 : Courbes de survie après CLP chez la souris, selon le niveau de ligature (modifié d'après Rittirsch et al., 2009).	58
Figure 13 : Impact du sepsis sur les cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif (modifié d'après Hotchkiss et al., 2013).....	63
Figure 14 : Parallèle entre les réponses immunitaires d'un cancer et celles d'une infection prolongée (Hotchkiss and Moldawer, 2014)	65
Figure 15 : Schéma simplifié représentant les effets des immunoglobulines (modifié d'après Toussaint and Gerlach, 2012).....	68



Figure 16 : Image de microscopie électronique d'un agrégat de virions de TTV (Itoh et al., 2000).....	73
Figure 17 : Schéma de l'organisation des génomes des TTVs (Biagini and De Micco, 2010) ..	74
Figure 18 : Interrelation entre immunosuppression et immunocompétence dans les transplantations d'organes solides (modifié à partir de De Vlaminck et al., 2013).....	81
Figure 19 : Protocole d'extraction des acides nucléiques grâce au kit SaMag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Sacace Biotechnologies).	127
Figure 20 : Suivi de la charge virale du TTV à différents temps, chez des patients du groupe infection, sepsis et choc septique, comparés à des sujets sains.....	130
Figure 21 : Suivi de la charge virale du TTV dans le plasma et les leucocytes totaux au cours de l'hospitalisation de patients du groupe sepsis.	131
Figure 22 : Corrélation entre la charge virale au jour 0 du TTV et le nombre absolu de M-MDSC et de PMN-MDSC, chez les patients.....	132
Figure 23 : Corrélation entre les charges virales à jour 0 du TTV et le compte lymphocytaire et le compte monocytaire.....	133
Figure 24 : Stratégie de fenêtrage utilisée	140
Figure 25 : Effet du G-CSF sur les nombres absolus de cellules des lignées monocytaires et granulocytaires dans le sang, chez des donneurs de CSH avant et après traitement au G-CSF.	141
Figure 26 : Effet du G-CSF sur les pourcentages de cellules les lignées monocytaires et granulocytaires dans le sang, chez des donneurs de CSH avant et après traitement au G-CSF.	142
Figure 27 : Comparaison de la fréquence des populations monocytaires et granulocytaires dans deux types de greffons : la moelle osseuse et le produit d'aphérèse obtenu suite à un traitement par G-CSF.....	144
Figure 28 : Comparaison de la fréquence des populations monocytaires et granulocytaires dans les différents types d'échantillons analysés.....	146
Figure 29 : Expression de PD-L1 par les populations monocytaires et granulocytaires, dans les différents types d'échantillons analysés.....	148
Figure 30 : Schéma récapitulatif de l'origine, du devenir et de l'impact des MDSC au cours du sepsis.	160

Table des tableaux

Tableau 1 : Phénotypes minimums nécessaires à l'identification des MDSC chez l'homme et chez la souris (Bronte et al., 2016):.....	24
Tableau 2 : Rôles des MDSC dans différentes pathologies inflammatoires non néoplasiques.	37
Tableau 3 : Le score SOFA (d'après Vincent et al., 1996).....	45
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des effets cellulaires, moléculaires et cliniques du Syndrome de Réponse Anti-inflammatoire Compensatoire (CARs) au cours d'un sepsis (d'après Ward et al., 2008)......	53
Tableau 5 : Tableau récapitulatif du nombre d'échantillons testés et du nombre d'échantillons positifs pour le TTV au jour 0, pour chaque groupe de patients ou de contrôles :	129
Tableau 6 : Liste des différents anticorps utilisés :	139



Origine et rôles des cellules méyoïdes suppressives dans le sepsis

Les Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) sont une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures, regroupées en deux sous-populations : les monocytiques-MDSC (M-MDSC) et les polymorphonucléaires-MDSC (PMN-MDSC). Ces cellules ont des capacités immunosuppressives et peuvent exprimer le ligand PD-L1 induisant l'anergie des lymphocytes T qui expriment le marqueur PD-1. Au cours du sepsis, divers bouleversements immunologiques surviennent, et la fonction majeure des MDSC est probablement de réguler l'hyper-inflammation en participant à l'état d'immunodépression rencontré chez les patients. Ceux-ci ont alors un risque de développer des infections secondaires, et de réactiver des virus jusque-là en latence. Notre étude a pour objectifs de mettre en évidence l'origine des MDSC dans le sepsis, et d'approfondir leurs rôles dans l'état d'immunosuppression, notamment dans la réactivation du Torque Teno Virus (TTV). Nos résultats montrent tant *ex vivo* qu'*in vitro*, que dans le sepsis, les MDSC sont produites par la moelle osseuse, sous l'influence du G-CSF et de l'IL-6. Ces cellules exprimant PD-L1, sont augmentées dans le sang très tôt dans le sepsis et persistes au cours de l'hospitalisation. L'augmentation de la charge virale du TTV est observée dans le sang périphérique des patients, mais n'est pas corrélée à la fréquence des MDSC. Ces résultats suggèrent que lors d'un sepsis, l'orage cytokinique stimule la production de MDSC exprimant PD-L1 par la moelle osseuse, qui une fois en périphérie, vont participer à l'immunosuppression générale.

Mots-clés: **MDSC, sepsis, moelle osseuse, PD-L1, cytokines, TTV**

Origin and roles of myeloid-derived suppressor cells during sepsis

Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) are a heterogeneous population of immature myeloid cell, and are regrouped in two subsets: the monocytic-MDSC (M-MDSC) and the polymorphonuclear-MDSC (PMN-MDSC). These cells have immunosuppressive capacities and mainly act on T cells. MDSC can express the ligand PD-L1 and induce PD-1 expressing-T cells exhaustion. During sepsis, several immunological changes occur, and MDSC probably downregulate the hyper-inflammatory state, contributing to the immunosuppression phase encountered in patients after a sepsis. Immunocompromised patients can develop secondary infections, and reactivate latent virus. The aims of our study were to highlight the origin of MDSC in sepsis, and to explore their roles in the immunosuppression state, especially in the Torque Teno Virus (TTV) reactivation. Our results show, both *ex vivo* and *in vitro*, that in sepsis, MDSC originate from bone marrow are induced by G-CSF and IL-6. These PD-L1 expressing-cells are increased in peripheral blood very early in sepsis, and persist during hospitalization. These MDSC are able to inhibit T cells *in vitro*. The increase of TTV viral load is observed in peripheral blood of patients but is not correlated with MDSC frequencies. These results suggest that during sepsis, the cytokine storm boosts PD-L1 expressing MDSC's production by bone marrow, which contribute in peripheral blood to the immunosuppression.

Keywords: **MDSC, sepsis, bone marrow, PD-L1, cytokines, TTV**



