HAL
open science

Modifications immunitaires au décours de la fracture de l'extrémité supérieure du fémur : quel impact sur la résilience du sujet âgé ?

Hélène Vallet

To cite this version:

Hélène Vallet. Modifications immunitaires au décours de la fracture de l'extrémité supérieure du fémur : quel impact sur la résilience du sujet âgé ?. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS677 . tel-03828405

HAL Id: tel-03828405

https://theses.hal.science/tel-03828405v1

Submitted on 25 Oct 2022

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie, physiopathologie et thérapeutique ED 394

Centre d'Immunologie et de maladies infectieuses (CIMI)/ Equipe Immunopathogénèse des infections virales et vieillissement immunitaire

Modifications immunitaires au décours de la fracture de l'extrémité supérieure du fémur : quel impact sur la résilience du sujet âgé ?

Par Hélène Vallet

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Delphine Sauce

Présentée et soutenue publiquement le 08 octobre 2019

Mr FRIGUET Bertrand, PUPH, *président*

Mr DUFFY Darragh, chercheur statutaire Institut Pasteur, *rapporteur*

Mme BOURGEOIS Christine, CR INSERM, *rapporteur*

Mr GAVAZZI Gaëtan, PUPH, *examinateur*

Mme ELBIM Carole, PUPH, *examinateur*

Mme SAUCE Delphine, *directeur*

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.
Aux docteurs Christine Bourgeois et Darragh Duffy, merci d'avoir évalué avec attention mon travail en tant que rapporteurs.
Aux professeurs Bertrand Friguet et Carole Elbim, merci d'avoir accepté de participer à ma soutenance en tant qu'évaluateurs.
Au professeur Gaëtan Gavazzi, un grand merci d'apporter ta valence gériatrique et transversale dans l'évaluation de ma thèse.

Au Dr Delphine Sauce, travailler sous ta direction a été un vrai plaisir. Un grand merci pour tout ce que tu m'as appris, pour ta disponibilité et ta bienveillance. J'espère sincèrement que cette thèse n'est que le début d'une longue collaboration. Et vive le brocoli !

Au Dr Victor Appay et à toute l'équipe, merci de m'avoir accueillie et formée. Merci Solène de m'avoir accompagnée dans mes 1er pas au cytomètre. Merci Jessica de m'avoir énormément aidé dans les mises au point pendant toute ma période « d'immobilisation ». Un grand merci à toi Tina, pour ton aide, tes conseils précieux, et nos soirées à refaire le monde. Tu es devenue pour moi une véritable amie. A tous les autres membres de l'équipe qui m'ont accompagné pendant 3 ans : Laura, Francesco, Mariela, Ehogan, Camille, « Petit Victor ».

A Jacques, pour ton soutien sans faille.
Au Pr Bruno Riou, merci de m'avoir aidé à concrétiser ma 1ère année de thèse.

A mes amis et ma famille
A toi Eric

Table des matières

Liste des abbréviations 4
INTRODUCTION 6
PARTIE I : Le vieillissement clinique 7
1. **Définition** 7
2. **2. Épidémiologie** 8
3. **Vieillissement normal et pathologique** 10
PARTIE II : Immunosénescence 22
1. **Modifications du système immunitaire inné** 24
2. **Les modifications du système adaptatif** 28
3. **Les corécepteurs** 31
4. **Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)** 33
5. **Inflamm-aging** 35
6. **Le profil de risque immunologique ou « Immune Risk Profile » (IRP)** 37
7. **Les conséquences cliniques de l'immunosénescence** 37
8. **Interventions cliniques pour un vieillissement en bonne santé** 41
PARTIE III : Stress aigu, impact sur le système immunitaire 46
1. **Généralités** 46
2. **Modèle de stress aigu : la fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF)** 49
3. **La néoptérine** 54
4. **Le stress oxydatif** 58
5. **La reprogrammation monocytaire** 62
ETUDE PRELIMINAIRE 67
HYPOTHESES DU PROJET et OBJECTIFS 68
MATERIEL ET METHODES 70
RESULTATS 92
Préambule : analyse de la cohorte 93
Partie 1 : Étude des modifications phénotypiques induites par la FESF au sein du compartiment inné et adaptatif 97
Partie 2 : Fonctionnalité monocytaire et reprogrammation du monocyte au cours de la FESF 117
Partie 3 : fonctionnalité de la néoptérine 127
DISCUSSION 137
REFERENCES 147
Table des illustrations 165
ANNEXES 168

Liste des abbréviations

A-ß: amyloïde beta
ACTH: Adréno Cortico Trophic Hormone
ADL: activity of daily living
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPK: Adenosine monophosphate activated protein kinase
APOE4: Apolipoprotéine E4
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine tri phosphate
BH4 : tétrahydrobioptérine
CD : cluster de différenciation
CFS : clinical frailty scale
CIRS: Cumulative Illness Rating Scale
CMV: cytomegalovirus
CRH: Corticotropin Releasing Hormone
CRP: C-reactive protein
CSH : cellule souche hématopoïétique
CTLA-4 : Cytotoxique T Lymphocyte Antigen 4
CXCL : CXC chemokine ligand
CXCR: CXC chemokine receptor
DHEA: déhydroépiandrostérone
DMSO: diméthylsulfoxide
DSM5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EOMES: Eomesodermin
ERO : espèces réactives de l'oxygène
FACS: Fluorescence-activated cell sorting
FDA: Food and Drug Administration
FESF : fracture de l'extrémité supérieure du femur
FIH: asparaginyl-hydroxylase factor-inhibiting HIF
FOX: forkhead box
GC: glucocorticoïdes
GH: Growth Hormone
GILZ: Glucocorticoid-Induced Leucin Zipper
GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPx: glutathion peroxydase
GTP: guanosine triphosphate
HIF: hypoxia inducibe factor
HOCl: acide hypochloreux
HR: hasard ratio
HRP: horseradish peroxidase
HSP: heat shock protein
H2O2 : peroxyde d'hydrogène
IADL: instrumental activity of daily living
IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN- γ: interferon gamma
IGF: insulin-like growth factor
IL : interleukine
IMC : indice de masse corporelle
IRAKM: Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRP: immune risk profil
KO: knock out
LB: lymphocyte B
LDL: low-density lipoproteins
LPS: lipopolysaccharide
LT: lymphocyte T
LTA: acide lipoteichoïque
MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase
MMS: Mini Mental State
mTOR: mechanistic target of rapamycin
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFκB: nuclear factor-kappa B

NK : natural killer

NO : oxyde nitrique

NOS : oxyde nitrique synthetase

NOX : NADPH oxydase

OH• : radical hydroxyle

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns

PBMCs: peripheral blood mononuclear cell ou cellules mononuclées sanguines

PBS: Phosphate-buffered saline

PD-1: Programmed cell death 1

PDL-1: Programmed-death ligand 1

PHA: Phytohemagglutinin

PHD: oxygen-dependent prolyl hydroxylase

PNN : polynucléaire neutrophile

RC: restriction calorique

RNS: résidus nitrogènes

ROS: résidu du stress oxydant

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

SOD : superoxyde dismutase

SVF: serum de veau fœtal

TCR: T Cell Receptor

TGF-β: transforming growth factor beta

TIM-3 : T cell immunoglobulin and mucin domain 3

TLR: toll like receptor

TMB: Tetramethylbenzidine

TNF-α: tumor necrosis factor alpha

UCP : uncoupling protein

VZV: varicella zona virus

INTRODUCTION

PARTIE I : Le vieillissement clinique

1. Définition

Il n'existe pas de définition consensuelle du vieillissement. L'organisation mondiale de la santé définit comme âgée toute personne de plus de 60 ans. Dans la littérature médicale, la population âgée a été classée en 3 groupes distincts : les « young-old » (« jeunes vieux ») de 65 à 74 ans, les « middle old » (« vieux ») de 75 à 84 ans et les « older-old » (« les plus âgés des vieux ») au-delà de 85 ans. Dans les services de gériatrie, les patients ont généralement plus de 75 ans et la moyenne d'âge approche les 85 ans.

Cependant, le vieillissement ne peut se réduire à être défini par l'âge civil. Il s'agit d'un phénomène complexe associant des modifications physiologiques et des pathologies chroniques auxquelles se surajoute parfois un évènement médical aigu. Ces trois éléments entrainent une diminution des capacités de réserve de l'individu qui se traduit par une perte d'autonomie, de qualité de vie et qui parfois mène au décès du patient [1] (Figure 1).

Le vieillissement n'est pas homogène. Il existe de nombreuses variabilités intra et interindividuelles. En effet, tous les organes ne vieillissent pas de la même manière au sein d'un individu. De même, tous les individus ne sont pas égaux face au vieillissement. L'origine de cette variabilité n'est pas intégralement comprise mais il existe de nombreux facteurs environnementaux, génétiques, épigénétiques et biologiques entrant en ligne de compte [2, 3].

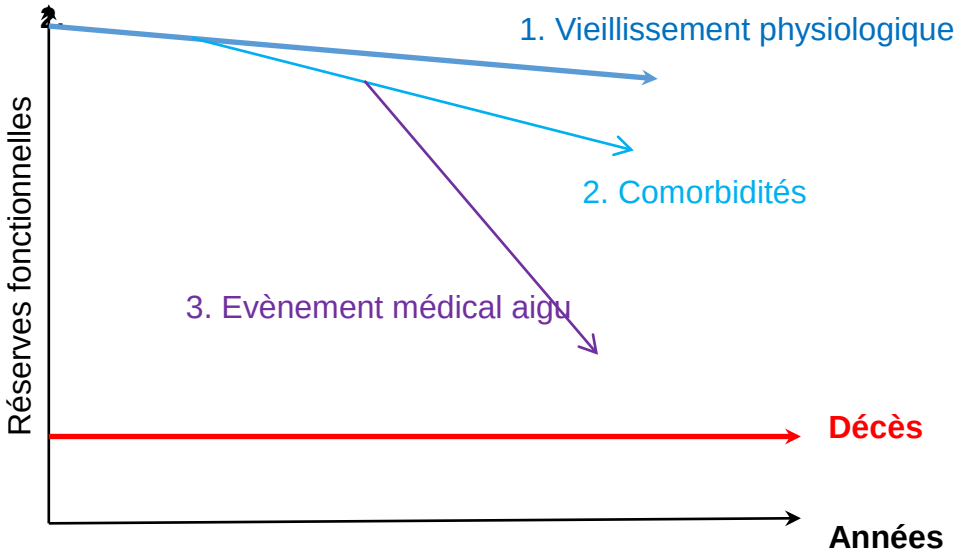


Figure 1 : Représentation schématique du vieillissement. Les modifications physiologiques inhérentes au vieillissement altèrent les réserves fonctionnelles de manière minime. Si l'on rajoute une ou plusieurs comorbidités, l'altération des réserves fonctionnelles devient significative. Plus le niveau basal des réserves est bas, plus le patient est à risque de décès en cas d'évènement médical aigu qui peut alors entrainer un effondrement de ces réserves. D'après *Bouchon et al. Rev Prat 1984*

2. Épidémiologie

La population mondiale vieillit, notamment dans les pays industrialisés. L'espérance de vie à la naissance en 2005-2010 était de 66 ans alors qu'elle était de 46 ans en 1950-1955 et devrait atteindre 76 ans en 2045-2050 [4]. En France, cette espérance de vie à la naissance est encore plus importante, atteignant 76 ans pour les hommes et 82 ans pour les femmes en 2010 [5]. La population âgée de plus de 60 ans a triplé au cours des 50 dernières années et triplera encore à l'horizon 2050. D'après les estimations, 10% de la population européenne aura plus de 80 ans en 2050 et les centenaires seront 3,2 millions à travers le monde, soit 18 fois plus qu'en 2000. Là encore, les pays industrialisés sont et continueront d'être les plus concernés par ce vieillissement [4].

Cette évolution, liée à la diminution de la mortalité et de la natalité, pose de réelles questions sociétales, économiques, médicales, scientifiques et éthiques. Une meilleure compréhension des phénomènes et mécanismes à l'origine du vieillissement est primordiale pour améliorer la prise en charge médicale de nos aînés et réduire les coûts pour la société. Le but n'est pas d'allonger à tout prix la durée de la vie mais sa qualité. En effet, un vieillissement « réussi » qui permet de gagner en espérance de vie sans incapacité est bénéfique tant pour l'individu que pour la société.

3. Vieillissement normal et pathologique

3.1 Le vieillissement physiologique

Le vieillissement physiologique comprend toutes les modifications induites par l'âge au niveau systémique, organique et cellulaire. Nous aborderons ici les principales modifications observées sur le muscle strié, les artères, le cœur, le poumon, et le cerveau. Le vieillissement physiologique du système immunitaire sera abordé dans un chapitre à part.

3.1.1 La sarcopénie

La sarcopénie se définit comme une réduction de la masse et de la fonction musculaire associée ou non à une involution graisseuse [6]. La diminution de la masse musculaire est liée à une diminution de la taille et du nombre de fibres musculaire [7], essentiellement de type II [7, 8]. Sur le plan cellulaire, on note une diminution du rendement énergétique de l'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'une diminution de la masse mitochondriale intramusculaire [9]. L'ensemble de ces mécanismes est lié à des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Parmi les facteurs intrinsèques, on retrouve les modifications hormonales induites par le vieillissement (diminution de l'IGF-1, augmentation du taux de cortisol endogène, insulinorésistance, diminution de la DHEA ainsi que des taux de testostérone et d'œstrogène), le phénomène d' « inflam-aging » développé dans la deuxième partie page 35-36 [9, 10] ainsi que des facteurs génétiques et nutritionnels. Les facteurs extrinsèques sont essentiellement représentés par le niveau d'activité physique [6]. Le muscle est l'un des premiers organes touchés par le vieillissement. La sarcopénie débute dès l'âge de 30 ans et s'accélère après 65 ans, en touchant en premier lieu les muscles des membres inférieurs [11]. L'évaluation clinique de la sarcopénie fait appel à plusieurs techniques

telles que l'évaluation clinique de la force musculaire (test de préhension par exemple), l'évaluation des performances physiques de l'individu et l'imagerie (scanner, Imagerie par Rayonnance Magnétique) [12]. Les conséquences de la sarcopénie sont multiples. Elle entraine des difficultés à accomplir les gestes de la vie quotidienne et donc une perte d'autonomie. Elle majore également le risque de chute, de fragilité et par là, le risque de morbi-mortalité globale [13]. Ainsi, dans une méta-analyse récente, les patients atteints de sarcopénie avaient presque 4 fois plus de risque de mortalité (OR=3,6 95% CI = 2.94 to 4.51) et presque 3 fois plus de risque de perte d'autonomie (OR = 2.58, 95% CI = 1.33 to 4.99) [14].

3.1.2 Le vieillissement artériel

Au cours du temps, l'endothélium et l'ensemble des structures composant les vaisseaux artériels et veineux (media et intima) subissent des modifications. Il existe une augmentation de l'accumulation de radicaux libres à l'origine d'un stress oxydatif, une hyperinflammation et une augmentation du phénomène de glycation non enzymatique des protéines. D'autre part la longueur des télomères est réduite, de même que les taux de pyrophosphate et d'ostéopontine qui sont des inhibiteurs de la calcification [15, 16]. L'ensemble de ces phénomènes entrainent une dégradation de l'élastine présente dans la paroi vasculaire au profit du développement de calcifications, du dépôt de collagène et de fibrose. Il en résulte une dilatation de l'artère et un épaississement de la paroi vasculaire [15]. Sur le plan fonctionnel, l'endothélium lésé est moins sensible aux molécules permettant la vasodilatation et l'artère se rigidifie [15]. Cliniquement, cela se traduit par l'apparition d'une hypertension artérielle systolique, présente chez plus de 75% des personnes de plus de 80 ans [17] et un risque majoré d'athérosclérose.

3.1.3 Le vieillissement cardiaque

Le muscle cardiaque subit également de nombreuses modifications au cours du temps. Sur le plan moléculaire et cellulaire, la diminution des mécanismes d'autophagie entraine un stress oxydant plus important et l'apparition de fibrose tissulaire [15, 18]. Le nombre de cellules telles que les myocytes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales diminue. Le fonctionnement des pompes calciques à l'origine de la contractibilité du muscle cardiaque est altéré [18]. La paroi du myocarde s'épaissit au dépend de la taille de la cavité du ventricule gauche en fin de diastole. La conséquence fonctionnelle est l'apparition d'un défaut de relaxation ventriculaire à l'origine d'une insuffisance cardiaque diastolique [18]. La fonction systolique est quant à elle préservée au repos mais les capacités d'adaptation à l'effort et au stress sont moins importantes.

3.1.4 Le vieillissement pulmonaire

Tous les composants de l'appareil respiratoire subissent des modifications au cours du temps. Au niveau de la cage thoracique, apparaissent des calcifications et une ankylose des articulations costo-vertébrales et chondro-costales. La cyphose dorsale s'accentue. Il en résulte une diminution de la compliance thoracique. La sarcopénie touchant les muscles inspiratoires et expiratoires entraine une moins bonne efficacité de la toux [19]. Le parenchyme pulmonaire perd de son élasticité, les alvéoles se dilatent alors que le calibre des bronches et des alvéoles se réduit. De plus, le nombre de cellules mucociliaires diminuent [20]. Il en résulte une augmentation de la compliance pulmonaire, une augmentation de l'espace mort et une diminution de la clairance du mucus. Au niveau des centres respiratoires, la sensibilité à l'hypoxie et à l'hypercapnie est diminuée. De plus les mécanismes de l'immunosénescence décrit

en deuxième partie engendrent une diminution des capacités de défense immunitaire au niveau local. L'ensemble de ces modifications aboutit à une majoration du risque infectieux [21]. A l'état basal, les échanges gazeux ne sont pas modifiés par rapport à un sujet plus jeune. En revanche, au cours d'un effort ou d'un stress (une infection par exemple), les capacités d'adaptation du patient âgé sont plus faibles entrainant une plus grande fréquence des décompensations respiratoires [19].

3.1.5 Le vieillissement cérébral

Avec le temps, le parenchyme cérébral a tendance à perdre en volume et en densité. Ce phénomène, appelé atrophie, prédomine au niveau du cortex préfrontal. L'atrophie est visible en imagerie (notamment sur le scanner cérébral) et se caractérise par des sillons trop visibles du parenchyme et une impression d'élargissement des ventricules cérébraux [22]. Au niveau cellulaire et moléculaire on assiste à une diminution du nombre et de la taille des dendrites et des synapses des neurones pyramidaux. La quantité de substance blanche diminue. De même, apparait une diminution de la synthèse de neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, la dopamine, la sérotonine et le glutamate [22]. Il en résulte une diminution des capacités attentionnelles, de la mémoire de travail, des fonctions exécutives (capacité à planifier une action), une plus grande difficulté dans la prise de décision et une diminution des capacités métacognitives (capacités à comprendre, prédire ou juger les comportements d'autrui) [23]. Cependant, à l'état physiologique ces modifications n'altèrent pas le fonctionnement normal de l'individu. Le vieillissement entraine donc une diminution des réserves cognitives [23], rendant le patient âgé plus à risque de complications telles que le syndrome confusionnel. Il est important de rappeler qu'il existe de grandes variabilités interindividuelles dans le vieillissement cérébral et que celui-ci est

également dépendant de facteurs environnementaux (niveau socio-économique, niveau scolaire, entourage familial).

3.2 Comorbidités

3.2.1 Données générales et scores

Le vieillissement se caractérise également par le développement de pathologies chroniques ou comorbidités. Le nombre de comorbidités par personne et sa fréquence au sein de la population augmente avec l'âge. En effet, après 75 ans, 90% de la population présente au moins une comorbidité et le nombre moyen est de 3 par personne [24] (Figure 2). Les plus fréquentes sont l'hypertension artérielle, le diabète, la bronchopneumopathie obstructive, l'insuffisance cardiaque chronique, les cancers et les pathologies démentielles [24, 25]. Le nombre de comorbidité est associé aux nombre d'hospitalisation, à la perte d'autonomie fonctionnelle [26] et à la mortalité [27].

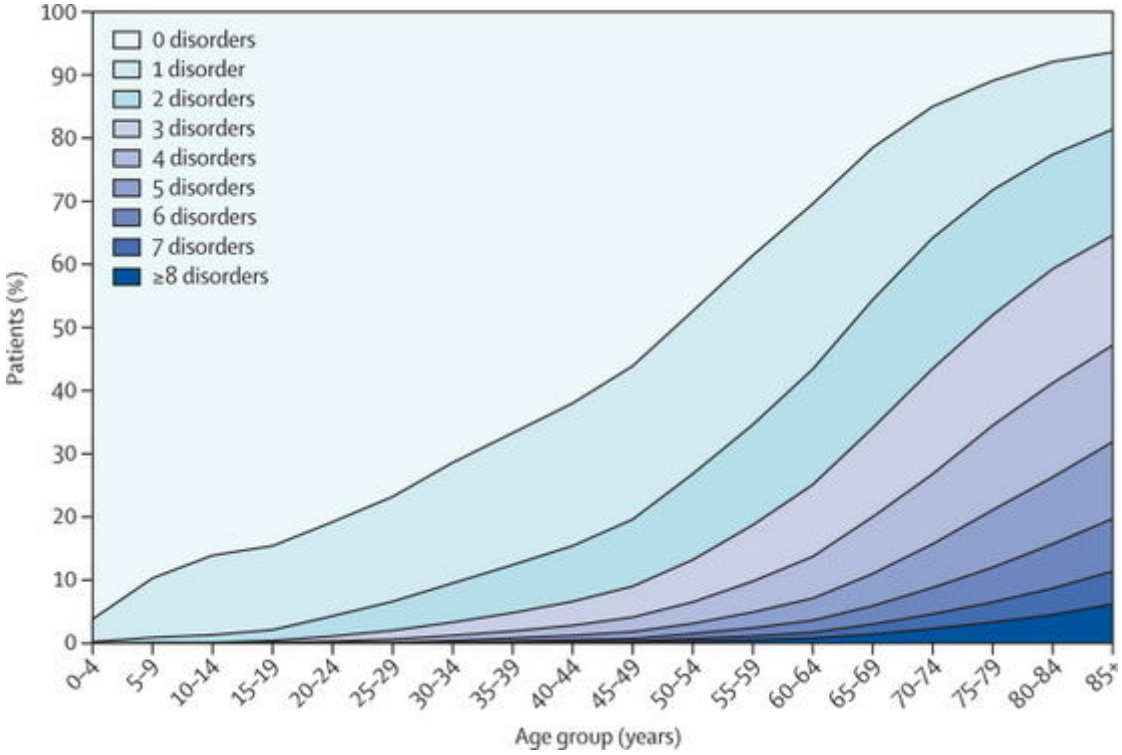


Figure 2 : Augmentation de la fréquence des comorbidités avec l'âge. Après 75ans, 90% des patients présentent au moins une comorbidité. D'après *Barnett et al. Lancet 2012.*

Plusieurs scores sont utilisés en gériatrie pour estimer le poids global de ces comorbidités. Parmi les plus fréquemment utilisés, on retrouve le « Cumulative Illness Rating Scale » (CIRS) [28] et le score de Charlson [29]. Ces scores sont prédictifs de la mortalité à court et à long terme des patients âgés. Les composantes des 2 scores sont rapportées dans les tableaux 1 et 2. Le CIRS a l'avantage d'être plus complet et de permettre une cotation plus fine des comorbidités. Il existe différente façon d'analyser les résultats du CIRS : par le score total, par le nombre de catégories ayant un score supérieur à 0, par le rapport du score total sur le nombre de catégories (index de sévérité) et par le nombre de catégories obtenant un score de gravité 3 ou 4 [30].

Tableau 1 : Score de Charlson

Comorbidités	**Points**
Tumeur solide métastatique	6
SIDA	6
Maladie hépatique modérée à sévère	3
Hémiplégie	2
Maladie rénale modérée à sévère	2
Diabète avec atteinte d'un organe cible	2
Tumeur solide autre	2
Leucémie	2
Lymphome	2
Infarctus du myocarde	1
Insuffisance cardiaque chronique	1
Maladie vasculaire périphérique	1
Accident vasculaire cérébral	1
Démence	1
Maladie pulmonaire chronique	1
Connectivite	1
Maladie ulcéreuse	1
Maladie hépatique légère	1
Diabète	1
Total	

Tableau 2 : Score de CIRS

Comorbidités	SCORE (0 à 4)
Cardiaque : Cœur seulement	
Hématologique : Sang, moelle osseuse, rate, vaisseaux sanguins, ganglions	
Hypertension artérielle : Cotation fondée sur la sévérité (organes touchés cotés séparément)	
Respiratoire : Poumons, bronches, trachée sous larynx	
ORL et Ophtalmologique : Oreilles, nez, larynx, yeux	
Appareil digestif supérieur : Œsophage, estomac, duodénum, voies biliaires, pancréas	
Appareil digestif inférieur : Reste des intestins, dont hernies	
Hépatique : Foie seulement	
Rénal : Reins seulement	
Genito-urinaire : Uretères, urètre, prostate, vessie, gonades	
Musculo-squelettique et téguments : Muscles, os, peau	
Neurologique : Cerveau (démences exclues), moelle épinière, nerfs	
Endocrino-métabolique : Diabète, infection diffuse, intoxication	
Psychiatrie : démences, agitation, dépression, anxiété, psychoses	
TOTAL	

0 : Pas de problème
1 : Problème léger, modéré ou insignifiant
2 : Morbidité modérée contrôlée par un traitement
3 : Morbidité sévère constante non contrôlée
4 : Morbidité très sévère - Mise en jeu du pronostic vital

3.2.2 La dénutrition

La société Européenne de nutrition et métabolisme défini la dénutrition comme un indice de masse corporelle (IMC) inférieur à 18Kg/m^2 ou l'association d'une perte de poids involontaire associé à un des critères suivants : IMC<22Kg/m^2 chez le sujet âgé ou un indice de masse grasse <15kg/m^2 chez les femmes et <17Kg/m^2 chez les hommes. La dénutrition est fréquente chez les patients âgés. Elle concerne 12 à 45% des patients hospitalisés [31] et est associés à de nombreuses complications telles que l'augmentation de la durée d'hospitalisation, une plus mauvaise autonomie fonctionnelle et/ou qualité de vie mais encore à un taux plus élevé de mortalité [32]. De plus la dénutrition est un élément important du syndrome de fragilité [33] qui sera abordé dans un autre chapitre.

3.2.3 Les troubles cognitifs

Les troubles cognitifs font partie des comorbidités les plus fréquentes chez les patients âgés. Leur prévalence augmente avec l'âge de 0,8-0,9% entre 60-65 ans à 25-30% à partir de 85 ans en Europe et aux Etats-Unis [34]. Ces troubles cognitifs peuvent rentrer dans le cadre d'une démence de type dégénérative, telle que la maladie d'Alzheimer (la plus fréquente) ou la démence à corps de Lewy, ou dans le cadre d'une démence de type vasculaire (faisant suite à de nombreux accidents vasculaires cérébraux). Les critères diagnostiques (DSM5) établis par l'American Psychiatrique Association [35] définissent le trouble neurocognitif majeur (ou anciennement démence) comme:

A. La mise en évidence d'un déclin cognitif significatif observé par le patient, l'un de ses proches ou objectivé par une évaluation neuropsychologique standardisée.

B. Ce déclin doit entrainer une diminution des capacités de l'individu à être autonome dans la vie quotidienne
C. Ce déclin doit être objectivé en dehors de tout épisode confusionnel
D. Il ne doit pas être expliqué par une autre atteinte du système nerveux central ni par une pathologie psychiatrique.

Il existe de nombreux facteurs de risque associés à la démence : facteurs génétiques (APOE4 et maladie d'Alzheimer), médicaux (pathologie cardiovasculaire et démence vasculaire), dépression, traumatisme crânien, tabac. D'autres facteurs sont au contraire protecteurs : haut niveau éducatif, bilinguisme, activité physique, régime méditerranéen [36].

3.2.4 Les pathologies cardiovasculaires

Les pathologies cardiovasculaires sont un groupe de pathologies regroupant l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque chronique, la fibrillation auriculaire, l'infarctus du myocarde ou encore les valvulopathies. En France, elles représentent la deuxième cause de mortalité après les cancers. D'après l'institut de veille sanitaire, elles étaient à l'origine de plus de 140000 décès en 2013 [37]. Les patients âgés sont les plus exposés à ces pathologies. En effet, entre 40 et 60 ans, la prévalence est estimée à 40% pour atteindre 80% après 80 ans [38]. De plus, 80% des décès liés à une pathologie cardiovasculaire concernent des personnes de plus de 65 ans.

3.2.5 L'ostéoporose

L'ostéoporose correspond à une perte de densité osseuse associée à des anomalies structurelles du tissu osseux qui fragilisent l'os. Particulièrement fréquente dans la population âgée, elle se complique de fracture survenant après des traumatismes

mineurs. On distingue les fractures sévères (col fémoral, fracture vertébrale) des non sévères (poignet). En France, on estime que le taux annuel de ces fractures est de 70000 pour les vertèbres, 60000 pour le col fémoral et 35000 pour le poignet [39]. L'incidence de ces fractures augmente considérablement avec l'âge [40], notamment après 50 ans chez les femmes et 75 chez les hommes. Les fractures ostéoporotiques sont associées à une surmortalité dans la population âgé, augmentant par 2 le risque de décès en cas de fracture sévère [39].

3.3 Autonomie fonctionnelle

Restaurer une bonne autonomie fonctionnelle aux patients âgés est un enjeu majeur en gériatrie. En effet, plus que le nombre d'année de vie gagnée, c'est le nombre de vie gagnée sans incapacité majeure qui représente un véritable intérêt pour le patient et pour la société. Plusieurs scores permettent d'évaluer rapidement cette autonomie fonctionnelle tels que l'échelle des activités de la vie quotidienne (ADL) [41] et l'échelle des activités instrumentales de la vie quotidienne (IADL) [42]. L'échelle des ADL permet de coter de 0 à 6 les activités de base de l'individu en incluant la capacité à se laver, s'habiller, marcher, être continent, manger, aller aux toilettes. Le patient peut être totalement (1 point), partiellement (0,5 point) ou pas du tout (0 point) autonome pour chacune de ces activités [41]. L'échelle des IADL permet d'évaluer des activités plus complexes. Elle est composée de 8 items : capacité à utiliser le téléphone, à faire ses courses, à préparer à manger, à faire le ménage, à s'occuper du linge, à prendre les transports en commun, à gérer seul ses traitements et ses comptes [42]. Cette dernière évaluation étant un peu longue à réaliser en pratique, une version simplifiée

reprenant les 4 items (téléphone, transports en commun, traitement et comptes) les plus sensibles et spécifiques est fréquemment utilisée en pratique clinique [43].

3.4 Syndrome de fragilité

La fragilité est un syndrome typiquement gériatrique qui se définit comme une vulnérabilité inhérente à l'individu entrainant des difficultés à surmonter un stress aigu [44]. Le modèle de fragilité le plus récent est multi-domaine, incluant les modifications physiologiques, les comorbidités, la perte d'autonomie fonctionnelle, l'état psychologique et l'environnement sociétal de la personne âgée [44, 45]. Rockwood *et al*. a proposé un score de fragilité appelé le « clinical frailty scale » (CFS) révisé en 2008, très simple à utiliser en pratique clinique. Il permet de classer les patients en 9 catégories allant de très en forme (1) à stade terminal (9) en fonction des items sus-décrits [46, 47]. Plus le score de fragilité est élevé, plus le risque de mortalité et d'entrée en institution est élevé [46]. De plus, la fragilité est associé à un plus grand risque de chute, de perte de mobilité et d'hospitalisation [48].

3.5 La résilience

La résilience n'est pas à proprement parler une caractéristique gériatrique. Il s'agit d'un concept issu de la psychiatrie qui se définit par la capacité d'une personne à surmonter un stress psychologique intense et à se reconstruire. Plusieurs mécanismes neurobiologiques sont impliqués dans la réponse d'un individu au stress psychologique, notamment la voie hypothalamo-hypophysaire qui représente une voie clé dans la réponse neuroendocrine au stress. D'autres voies sont également impliquées telles que la voie dopaminergique, la sérotoninergique ou cholinergique. Plusieurs pistes de recherche travaillent à moduler ces voies afin d'augmenter la résilience des patients : activation des neurones dopaminergiques, activation des

récepteurs alpha2 adrénergiques, antagonisation des récepteurs CRH-1 (Corticotrophin-Releasing Hormone)…[49].

Le vieillissement physiologique impactant tous ces systèmes, les patients âgés sont plus susceptibles au stress et moins résilients que les plus jeunes, d'autant plus quand se surajoutent des comorbidités [49]. De plus, les voies activées par un stress psychologique sont également activées au cours d'un stress physique. C'est la raison pour laquelle nous avons adapter le concept de résilience au stress physique induit par la FESF.

PARTIE II : Immunosénescence

Le vieillissement est associé à un déclin des compétences du système immunitaire, appelé immunosénescence, touchant aussi bien le compartiment inné qu'adaptatif [50]. Il s'y associe un deuxième phénomène appelé « inflamm-aging » caractérisé par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires. L'ensemble de ces modifications diminue les capacités du patient âgé à produire une réponse immune efficace. Le vieillissement du système immunitaire s'accompagne de nombreuses conséquences cliniques telles que l'augmentation de l'incidence des cancers, des maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, l'augmentation de la sévérité des infections et la diminution de l'efficacité vaccinale [51] (Figure 3)

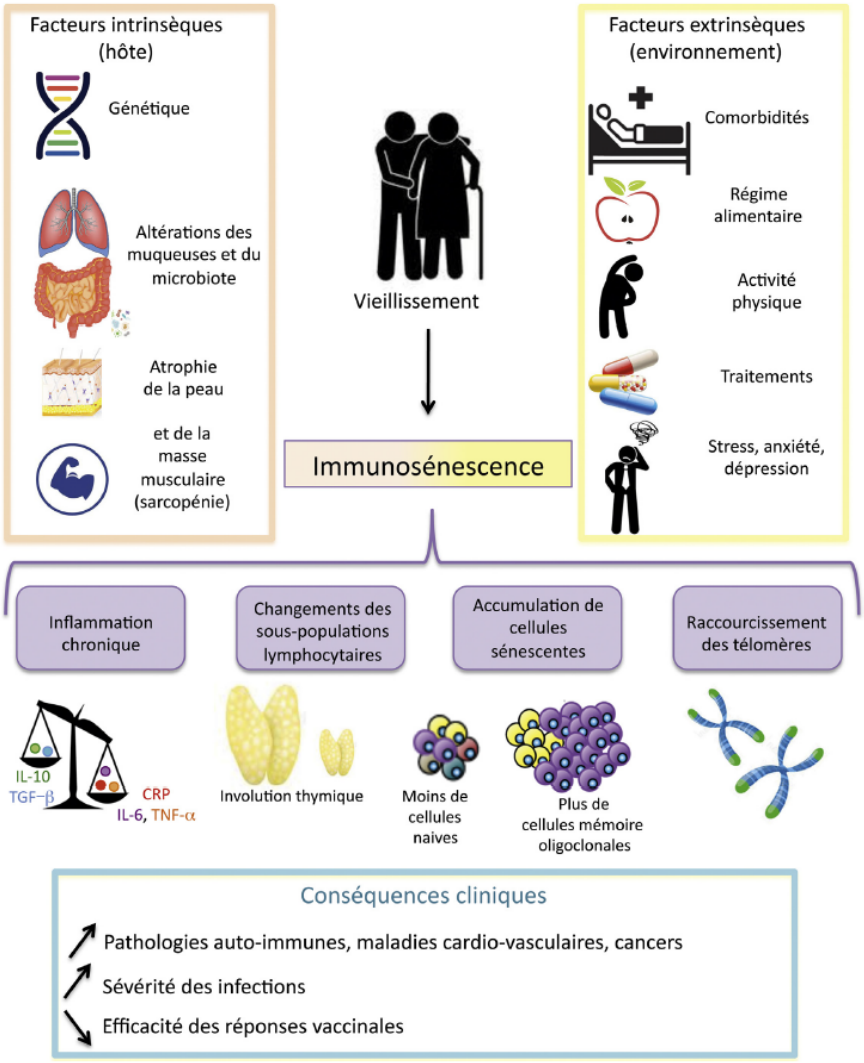


Figure 3 : Mécanismes de l'immunosenescence et retentissement clinique. De nombreux facteurs extrinsèques et intrinsèques sont à l'origine des mécanismes du vieillissement immunitaire. L'association d'un état hyper-inflammatoire chronique et d'altérations phénotypiques et fonctionnelles des cellules du système immunitaire est associée à de nombreuses pathologies associées au vieillissement. D'après *Vallet et al. Revue de médecine interne 2018*.

1. Modifications du système immunitaire inné

Le vieillissement impacte peu les cellules du système immunitaire inné en termes d'effectif. En revanche, il entraine de profondes modifications fonctionnelles.

1.1 Les monocytes

Les monocytes sont classiquement subdivisés en 3 catégories qui ont un phénotype et une fonction propre. Chez l'homme, ils sont identifiés par les marqueurs de surface CD14+ et CD16+. Les monocytes « classiques » sont CD14+/CD16- et sont majoritaires, les monocytes « intermédiaires » sont CD14+/CD16+ et les non conventionnels (minoritaires) sont CD14-/CD16+ [52]. Les monocytes CD16- expriment le CCR2 et migrent en réponse au CCL2 leur permettant de sortir de la moelle osseuse et de migrer vers le site inflammatoire. Les monocytes CD16+ expriment quant à eux le CX3CR1 leur permettant de migrer en réponse au CX3CL1 vers les cellules endothéliales et donc les vaisseaux en cas d'inflammation [53–55]. L'analyse transcriptomique comparant les monocytes CD16+ des CD16- a montré de nombreuses différences d'expression entre les 2 populations. Ainsi les CD16- expriment plus de gènes impliqués dans l'hématopoïèse, l'endocytose et le métabolisme de l'arginine et de la proline alors que les CD16+ sont enrichis en gènes codant pour l'activité cytotoxique NK-médiée, le métabolisme du phosphate inositol, et le stress oxydatif suggérant qu'ils sont à un stade plus avancé de différenciation [56]. Les fonctions des sous-types de monocytes sont différentes. En effet, les monocytes conventionnels et intermédiaires sont plus efficaces dans la phagocytose que les non conventionnels [57]. De plus, ils produisent plus de ROS. Les cytokines qu'elles produisent en réponse à une stimulation sont également différentes. Les monocytes conventionnels et intermédiaires produisent des cytokines pro-inflammatoires comme

l'IL-8 et de l'IL-6 mais aussi de l'IL-10 après stimulation par du LPS [57]. Les non conventionnels sont des producteurs de TNFα et d'IL-1β après stimulation des TLR-4, 7 et 8 [57, 58]

Le nombre de monocytes et de macrophages d'un sujet âgé est relativement comparable à celui d'un sujet jeune. On assiste en revanche à une évolution des monocytes vers un profil plus inflammatoire. Ainsi le nombre de monocytes pro-inflammatoires (CD14high/CD16+) et non conventionnels (CD14low/CD16+) augmente avec l'âge, au détriment des monocytes conventionnels (CD14+/CD16-) [59]. De plus, les monocytes des patients âgés expriment plus fortement le CD11b (intégrine impliquée dans la migration cellulaire) et plus faiblement la L-selectin (molécule impliquée dans l'adhésion épithéliale) ce qui affecte la fonctionnalité de ces monocytes [60, 61]. Les monocytes des patients âgés présentent une diminution de l'expression de TLR1 à leur surface [59]. Après stimulation de TLR4, les monocytes intermédiaires et non conventionnels (contrairement aux conventionnels) ont une capacité plus importante à produire du TNFα comparativement aux sujets jeunes. De plus, les capacités de phagocytose des CD14+ sont altérées par rapport aux sujets jeunes [60].

1.2 Les macrophages

Les macrophages sont issus de la différenciation intra-tissulaire des monocytes. Ils ont pour principal rôle la phagocytose et la présentation de l'antigène au système adaptatif. Schématiquement, il existe 2 principaux types de macrophages : les M1 « pro-inflammatoires » et les M2 « anti-inflammatoires ou immunomodulateurs ». Les macrophages de type 1 s'activent suite à une stimulation par l'IFN-γ seul ou combiné au LPS ou au PAMPs. Ils secrètent alors de nombreuses cytokines pro-inflammatoires

(IL-6, TNFα, IL-8, IL-1β), des ROS et des chemokines (dont CXCL10 et CCL2). Ils vont également recruter les LTh1 et surexprimer des molécules de costimulation comme le CD40, le CD80 et le CD86 [62]. Le rôle de ces macrophages est essentiellement lié à la phase aiguë d'un processus inflammatoire en induisant l'apoptose cellulaire, la destruction des microorganismes et en favorisant la présentation de l'antigène. Les macrophages de type 2 sont eux même subdivisés en 3 groupes en fonction de leur stimuli d'activation : IL-4/IL-13 ; TLR/ligand de l'IL-1R ; IL-10. Ils vont sécréter majoritairement des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGFβ et ont un rôle essentiel dans l'immunomodulation et le remodelage tissulaire, au décours d'un évènement inflammatoire aigu [63].

Les données concernant le vieillissement des macrophages sont parfois contradictoires. Les capacités de phagocytose *in vivo* sont altérées pour les macrophages résidants dans le péritoine ou la peau [64–66]. En revanche, elles sont augmentées dans les macrophages alvéolaires et les cellules de Kuppfer (macrophage hépatique) [67, 68]. La répartition phénotypique des macrophages est également modifiée en fonction des tissus. Ainsi, au sein du tissus adipeux et du foie, les vieilles souris ont plus de macrophages pro-inflammatoires de type M1 alors qu'au sein de la moelle osseuse, la rate, les ganglions lymphatiques le poumon et les muscles les macrophages de type M2 sont prédominants [62]. Dans certaines études, l'activation *in vitro* des macrophages par le LPS entraine une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1β, TNFα) et de ROS par les macrophages de souris âgées comparativement aux jeunes [69–71]. Dans l'étude de Smalwood *et al.*, il existe une augmentation de la production de ROS par les macrophages des vieilles souris après exposition au LPS. De plus, l'analyse protéomique met en

évidence une surrégulation des protéines impliquées dans l'activation macrophagique et l'activité antimicrobienne de ces mêmes souris [72].

1.3 Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent l'une des premières barrières de l'immunité anti-infectieuse. En condition inflammatoire, ils ont la capacité de migrer sur le site grâce à l'expression de certaines chemokines et molécules d'adhésion à l'endothélium. Ils ont ensuite un rôle de phagocytose et sont protégés de l'apoptose à la phase aiguë de l'inflammation.

Les neutrophiles sont également impactés par le vieillissement. Alors que leur nombre reste relativement constant au cours du temps [73], leurs fonctionnalités sont altérées [74, 75]. Ainsi, on assiste à des modifications phénotypiques vers un profil de neutrophiles plus suppressifs (CD16bright/CD62Ldim) [76]. L'expression de CXCR4 est augmentée entrainant un retour du neutrophile vers la moelle osseuse et sa clairance [77]. De plus, leur capacité d'activation après stimulation par le LPS est plus faible, leurs capacités de phagocytose, de chimiotactisme et de production de résidu du stress oxydatif sont diminuées [76, 78, 79]. Ces modifications fonctionnelles sont le reflet de modifications au sein des voies de signalisation du neutrophile. Il existe par exemple des altérations de la transduction de signal via les « Toll-like recepteurs (TLRs) », le « granulocyte-macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF) ou encore la voie « p38 mitogen-activated protein kinase » (MAPK) [73].

2. Les modifications du système adaptatif

2.1 Lymphocytes T

Le vieillissement du compartiment lymphocytaire T est caractérisé par 3 grands types de modifications (Figure 4):

a) Une diminution du nombre de lymphocytes T (LT) naïfs secondaire à l'involution thymique. Le thymus, organe lymphoïde primaire, est le siège de l'éducation des précurseurs lymphoïdes en LT naïfs. Au cours du temps, il subit de profondes modifications fonctionnelles. La masse de tissu fonctionnel diminue au profit d'une accumulation graisseuse entrainant une diminution de la production de LT naïfs avec l'âge [80, 81].

b) Un appauvrissement du répertoire T par restriction du TCR. Le TCR, par phénomène de réarrangements géniques, a la capacité de reconnaitre une infinité d'antigènes. Or, au cours du vieillissement, le taux de réarrangements diminue entrainant une perte de diversité du compartiment T ce qui conduit à une moins bonne capacité à reconnaitre un nouvel antigène [82, 83].

c) Une augmentation de la proportion de LT mémoires oligoclonaux, particulièrement impliqués dans le contrôle d'infections virales persistantes telles que le cytomégalovirus [84].

On note également, au cours du vieillissement, des modifications du profil d'expression génique au sein des sous-populations lymphocytaires T touchant aussi bien des marqueurs de surface que des récepteurs aux chimiokines/cytokines, des molécules effectrices ou des facteurs de transcription. Certains LT mémoires modifient leur phénotype : ils perdent l'expression du CD28, acquièrent des marqueurs de cellules NK (CD57+, CD16+), voire ré-expriment le CD45RA qui est habituellement un

marqueur des LT naïfs [85, 86]. Ces cellules T effectrices/sénescentes ont de faibles capacités de prolifération et de production d' IL-2 [86]. De nombreuses modifications ont été retrouvées au sein de ces cellules CD28- telles qu'une augmentation de l'expression de CX3CR1, une augmentation de l'expression d'IL-13, CCL4 et Granzyme B, une diminution de l'expression de l'IL-7R et de l'IL-12R [87]. On retrouve également une augmentation de l'expression des facteurs de transcription T-bet (impliqué dans le développement TH1) et EOMES (impliqué dans la production d'IFNγ, de perforine et de Granzyme B). En revanche, l'expression de MYC, impliqué dans l'apoptose et la différenciation, est réduite chez la personne âgée [87].

Les LT régulateurs (LTreg) sont un sous-type de lymphocytes CD4+ ayant des fonctions de régulation via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGFβ). Ils sont caractérisés par l'expression membranaire de CD25+ et par leur facteur de transcription FOXP3. Le taux LT CD4+ régulateurs natifs augmente avec l'âge [88, 89]. La fonctionnalité de ces LTreg semble conservée voire augmentée par rapport aux sujets jeunes. En effet, *in vitro*, les LTreg entrainent une diminution de la prolifération des LT CD4+ et une diminution de leur capacité à produire de l'IFN-γ en réponse à une stimulation [89]. Sur un modèle murin, les LT reg « âgés » entrainent une diminution de la prolifération des LT CD4+ de 20 à 80% contre 3 à 50% pour les « T-reg » jeunes [88].

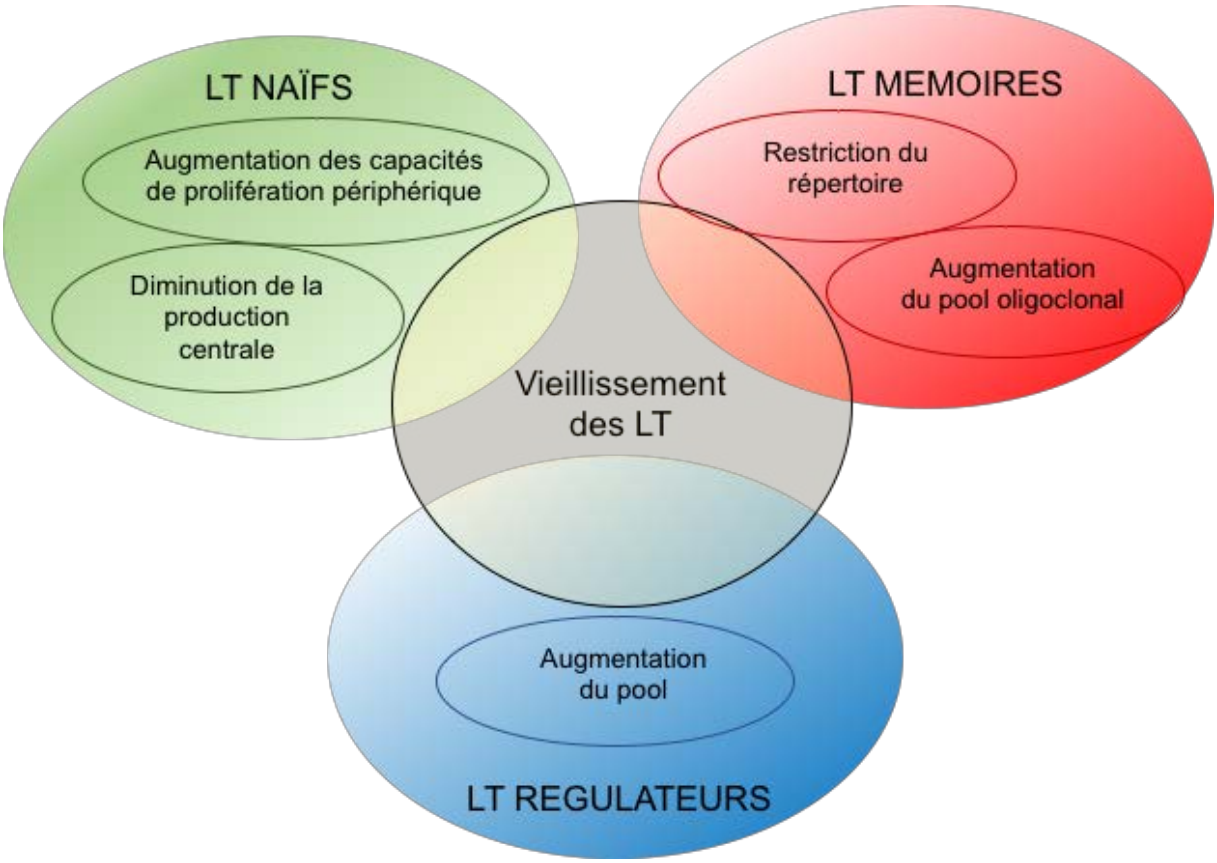


Figure 4: Représentation schématique du vieillissement lymphocytaire T. On assiste à une diminution du pool de LT naïfs et à une augmentation de leur capacité de prolifération périphérique. Les LT mémoires sont plus nombreux mais perdent de leur polyclonalité. Leur répertoire T est retreint. Les LT régulateurs sont quant à eux plus nombreux. D'après *Goronzy et al. Immunity 2017*

2.2 Lymphocytes B (LB)

Il a été rapporté que les changements associés à l'âge dans la distribution des cellules B périphériques reflètent à la fois une diminution de la production de cellules B à partir de la moelle osseuse et une augmentation de la longévité des LB. Effectivement, le nombre de LB dans la périphérie diminue chez les personnes âgées. Dû à la diminution de la génération des LB progéniteurs précoces, la production de nouveaux LB naïfs est réduite [90, 91] et, par conséquent, les LB mémoire ayant rencontré un antigène sont majoritaires [91]. En outre, la recombinaison de commutation de classe est altérée dans les LB mémoire ce qui conduit à une production altérée d'anticorps protecteurs de plus haute affinité, participant ainsi au déclin de la qualité de la réponse humorale avec le vieillissement. En outre, l'expansion de LB mémoires oligoclonales est reliée à des incidences accrues de malignité des LB [92] ou de maladies auto-immunes observées chez les personnes âgées.

3. Les corécepteurs

3.1 Au sein des LT

Les corécepteurs inhibiteurs exprimés à la surface des LT sont une cible récente en thérapie anti-tumorale. Les deux principaux représentants appartiennent à la famille B7 et sont le PD-1 et le CTLA-4 [93, 94]. Après stimulation par leurs ligands (PDL-1, PDL-2, CD80, CD86) ils entrainent une inhibition de l'activation lymphocytaire et jouent un rôle important dans la régulation de l'immunité. D'autres corécepteurs inhibiteurs ont été décrits plus tardivement : LAG-3, TIM-3, 2B4. Les modifications induites par le vieillissement sur ces mécanismes de régulation sont encore mal connues. Pourtant leur compréhension est fondamentale au vu du développement considérable des

inhibiteurs de ces corécepteurs en thérapeutique. Chez l'homme, certaines études montrent une augmentation de l'expression de CTLA-4, PD-1, LAG-3 et 2-B4 à la surface des LT CD8+ et de l'expression de CTLA-4 et PD-1 à la surface des LT CD4+avec l'âge [95–97]. Canaday *et al*., au contraire, montrent une diminution de l'expression de PD-1 et TIM-3 à la surface des LT CD8+ [95]. En revanche, les éventuelles modifications de la fonctionnalité de ces corécepteurs au cours du vieillissement restent à explorer.

3.2 Au sein des monocytes

Les monocytes expriment également certains corécepteurs comme le 4-1BB (CD137), le 2-B4 (CD244) et le PD-1 [98–100]. Leur fonctionnalité est très mal connue. Il semblerait que le 4-1BB est une fonction immunosuppressive sur le monocyte alors qu'il est activateur sur les LT. En effet, son inhibition entraine la production d'IFN-γ et de TNF-α par les monocytes dans un contexte d'infection à *Mycobacterium tuberculosis* [98]. Le PD-1 exprimé par les monocytes aurait une action plutôt immunosuppressive dans un contexte de choc septique [99] ou de l'infection VIH [101]. La fonctionnalité de 2-B4 exprimé par les monocytes n'est pas connu [100] et il n'y a pas de données dans la littérature à notre connaissance sur l'expression de LAG-3 par les monocytes ni sur les conséquences du vieillissement sur ces corécepteurs au sein des monocytes.

4. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Les CSH sont les cellules précurseurs des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Chez l'homme, elles peuvent être identifiées grâce à leur phénotype CD34+ CD38- CD45RA- Lin-. La maintenance d'un système immunitaire efficace dépend de la capacité des CSH à produire un pool constant de cellules immunitaires matures.

Le vieillissement affecte toutes les cellules immunitaires, y compris les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Sur le plan quantitatif, le nombre de CSH CD34+ augmente avec l'âge [102]. En revanche, la répartition entre les compartiments myéloïdes et lymphoïdes est perturbée. En effet, alors que le ratio myéloïde sur lymphoïde est égal à 1 chez le sujet jeune, il augmente considérablement au cours du vieillissement [102]. Sur le plan qualitatif, les CSH vieillissantes présentent une perte importante de fonction. Leur capacité de régénération et d'auto-renouvellement est altérée, elles sont moins mobiles et produisent plus de ROS [103, 104]. Ces altérations fonctionnelles sont liées à un mécanisme plurifactoriel incluant des lésions de l'ADN cellulaire, le stress oxydant, une diminution de l'activité télomérase et des facteurs épigénétiques [104, 105].

Tableau 3 : Principales modifications induites par le vieillissement sur les cellules du système immunitaire

Système/ Type cellulaire	Quantité	Fonctionnalité
Inné		
Monocytes	Nb total stable ↗ des intermédiaires (CD14+CD16+) et non conventionnels (CD14-CD16+)	↘ des capacités de phagocytose des CD14+ ↗ des capacités de migration cellulaire (CD11b) ↘ des capacités d'adhésion épithéliale (CD11c) ↗ des capacités de production de TNF-α par les CD16+
Macrophage	Nb total stable ↗ des M1 dans le tissu adipeux et le foie ↗ des M2 dans la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques	Capacités de phagocytose - ↗ pour les macrophages résidants dans le péritoine et la peau - ↘ pour les macrophages alvéolaires et hépatiques Capacités de production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS - ↘ [69–71] - ↗ [72]
PNN	Nb total stable ↗ de la proportion de $CD16^{bright}CD62L^{dim}$ (profil suppressif)	↗ de la clairance (CXCR4) ↘ des capacités d'activation via TLR4 ↘ des capacités de phagocytose ↘ des capacités de chimiotactisme ↘ des capacités de production de ROS
Adaptatif		
Lymphocytes T (LT)	↘ des LT naïfs ↗ des LT mémoires ↘ de l'expression de CD28 (LT effecteur sénescent)	Restriction du TCR/répertoire T Oligoclonalité Pour les CD28- : - ↘ des capacités de prolifération - ↗ de l'expression de CX3CR1, IL-13, Granzyme B, IL-7R - ↗ de l'expression de T-bet et EOMES
LT régulateurs	↗ de leur nombre	↗ de leurs capacités suppressives

Corécepteurs inhibiteurs exprimés par les LT	↗ CTLA-4 et LAG-3 PD-1 : ↗ ou ↘ (ref)	**?**
Lymphocyte B (LB)	↘ des LB naïfs ↗ des LB mémoires	↘ de la recombinaison de commutation de classe ↘ de la production d'Ac
Cellules souches hématopoïétiques (CSH)	↗ de leur nombre ↗ du rapport myéloïde/lymphoïde	↘ des capacités d'auto-renouvellement ↗ de la production de ROS

5. Inflamm-aging

Le vieillissement s'accompagne d'un état inflammatoire systémique chronique de bas grade appelé « inflamm-aging » [106]. Il se caractérise par la production accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le « tumor necrosis factor alpha » (TNF-α) ainsi que par la production de C-réactive protéine (CRP) [107, 108]. Le niveau de cet état pro-inflammatoire est associé à un plus mauvais pronostic chez le patient âgé : augmentation de la morbi-mortalité, sarcopénie et fragilité [108].

L'origine de cet état pro-inflammatoire n'est pas complètement comprise à l'heure actuelle. Cette complexité tient au fait que de nombreux tissus et organes participent à la production de stimuli inflammatoires. Ceci inclut le système immunitaire mais aussi le tissu adipeux, le muscle squelettique, le foie et l'intestin. L'intestin pourrait avoir un rôle prépondérant puisqu'il constitue l'organe immunitaire le plus large de l'organisme et qu'il comporte des milliards de bactéries qui peuvent relarguer des stimuli inflammatoires dans la circulation. En dépit de son importance, les mécanismes fins (cellulaires et moléculaires) conduisant à ces sécrétions chroniques de bas bruit ne sont pas élucidés mais plusieurs hypothèses ont été émises incluant le stress, le stress

oxydatif [109], les lésions persistantes de l'ADN [110], le vieillissement des cellules souches [111] et l'inhibition de l'autophagie par l'activation de l'inflammasome [112]. Cette exposition continue à des débris cellulaires, des virus ou des radiations induit la sénescence cellulaire, associée au SASP (pro-inflammatory senescence-associated secretory phenotype). Tous ces mécanismes sont probablement intriqués et conduisent à la production de résidu du stress oxydatif (ROS). Les ROS entrainent des dommages cellulaires oxydatifs et amplifient la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, créant un véritable cercle vicieux où les lésions tissulaires et les mécanismes de cicatrisation progressent parallèlement, tandis que les dommages s'accumulent lentement et asymptomatiquement à travers les décennies. De plus, les altérations endocriniennes et métaboliques sont liées au déplacement de la production de cytokines vers un profil pro-inflammatoire, ce qui pourrait expliquer certaines pathologies liées à l'âge (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, pathologies cardio-vasculaires, ostéoporose, diabète, cancer et fragilité) [113, 114].

A contrario, les patients âgés présentant des taux de cytokines anti-inflammatoires élevés semblent vieillir en « meilleure santé » que les autres. Ainsi un taux élevé d'IL-10 est associé à un moindre risque de mortalité cardio-vasculaire [115] et se retrouve plus fréquemment chez les centenaires [116]. Le TGF-β se trouve également en concentration supérieure chez les centenaires comparativement aux sujets jeunes [116, 117].

6. Le profil de risque immunologique ou « Immune Risk Profile » (IRP)

La notion d'IRP, apparue dans les années 1990, regroupe plusieurs caractéristiques de l'immunosenescence. Il comprend l'inversion du rapport CD4+/CD8+, la diminution des CD19+ (LB), la diminution de la prolifération cellulaire induite par la Concavaline A et l'accumulation de LT CD8+CD28- qui serait liée à l'infection par le cytomégalovirus (CMV) [118–121]. Une première étude suédoise (OCTO) a montré que l'IRP était prédictif de la mortalité à 2 ans dans une cohorte de 102 patients âgés de 84 à 90 ans [118]. Une deuxième cohorte suédoise (NONA) incluant 138 patients âgés de 55, 92, 96 et 100 ans a renforcé ces résultats en montrant que les patients ayant un ratio CD4+/CD8+<1 étaient plus à risque de mortalité à 6 ans que les autres. De plus, ils montraient que les centenaires avaient un profil d'IRP « inversé » avec un ratio CD4+/CD8+ plus élevé et un plus faible nombre de LT CD8+CD28- [122]. Cependant la notion d'IRP reste controversée. En effet, une étude prospective espagnole a été réalisée en 2014 incluant 328 patients de 85 ans. Dans cette étude, l'IRP ne ressortait pas comme facteur associé à la mortalité à 3 ans en analyse multivariée contrairement à certains paramètres cliniques tels que le nombre de traitement pris et l'autonomie fonctionnelle [123].

7. Les conséquences cliniques de l'immunosénescence

L'immunosenescence induit une diminution des réserves fonctionnelles immunitaires en lien avec de nombreuses pathologies associées au vieillissement.

4.1 Sepsis et infections bactériennes

Le sepsis est treize fois plus fréquent dans la population âgée et est associé à deux fois plus de mortalité par rapport à la population jeune [124]. La forme la plus grave du sepsis est appelée état de choc septique. Il correspond à un état hyperinflammatoire

non contrôlé ou « tempête cytokinique » responsable d'une ou plusieurs dysfonctions d'organe. D'après les dernières recommandations de 2016, il se définit comme un sepsis associé à une hyperlactatémie supérieure à 2mmol/l après remplissage vasculaire adéquat et au besoin de drogues vasoactives pour maintenir une pression artérielle moyenne supérieure à 65mmHg [125]. Les personnes âgées sont plus à risque de développer un état de choc septique que les plus jeunes et le taux de mortalité est plus élevé dans cette population pouvant atteindre près de 55% des cas en intra-hospitalier [126].

Les germes en cause dans les sepsis diffèrent également entre les sujets jeunes et âgés. Dans le cas des pneumonies par exemple, un patient âgé sera plus fréquemment infecté par des germes tel que le *S. pneumoniae*, l'*H. influenzae*, le *S. aureus*, les bacilles à gram négatif ou les germes anaérobies [127]. Les patients plus jeunes sont quant à eux plus à risque de pneumopathies atypiques à germe intracellulaire tel que le *M. pneumoniae*.

4.2 Infections virales et vaccination

La prévalence et la gravité des infections virales diffèrent également entre les sujets jeunes et âgés. Dans le cas de la grippe la mortalité est de 16% dans la population âgée contre 6% dans la population jeune [128]. De plus, ces chiffres ne considèrent que de la mortalité de cause respiratoire. Elle est donc probablement sous-estimée car elle ne prend pas en compte la mortalité liée aux décompensations de comorbidités très fréquente dans cette population. Le nombre d'hospitalisations liées à la grippe est également plus important chez le patient âgé. Le zona est une pathologie virale fréquente dans la population âgée, liée à la réactivation du virus varicelle zona (VZV). Elle survient généralement après 50 ans et son incidence augmente progressivement

avec l'âge. Cette incidence est par ailleurs corrélée à la diminution des réponses T anti-VZV au cours du temps [129]. De nombreuses complications peuvent survenir au cours d'un zona (surinfection cutanée, œsophagite, pneumopathie, myocardite, atteinte ophtalmique) notamment chez le patient âgé. La complication la plus fréquente est la douleur post zostérienne qui peut toucher plus de 80% de la population de plus de 70 ans [130].

L'efficacité des vaccins est également réduite dans la population âgée. Pour la vaccination antigrippale, elle est estimée entre 17 à 53% chez le sujet âgé contre 70 à 90% chez le sujet jeune [131]. De nombreux mécanismes immunologiques sont en effet altérés tels que l'efficacité du priming des LT, la capacité de production d'anticorps par les LB et les capacités cytotoxiques de LT CD8+ [132]. Plusieurs stratégies ont été proposées pour augmenter l'efficacité des vaccins dans cette population parmi lesquelles l'utilisation d'adjuvants, l'augmentation de la dose d'antigènes vaccinaux ou l'utilisation de vaccin quadrivalent (pour la grippe)[133, 134]. L'efficacité des adjuvants est variable, ainsi le MF59 utilisé dans la grippe montre des résultats contrastés [133] alors que le AS01 semble très efficace dans la vaccination anti-zostérienne [135] qui est un vaccin à virus vivant atténué.

4.3 Cancer

L'incidence des cancers augmente avec l'âge. En France, 62% de la population atteinte d'un cancer a plus de 65 ans et 11% des nouveaux cas de cancer concerne les plus de 80 ans [136]. Les plus fréquents sont le cancer du sein, du poumon, de la prostate et du colon. Au sein d'un système immunitaire efficace, l'antigène tumoral est reconnu par la cellule présentatrice d'antigène qui va le présenter au LT. Celui-ci va s'activer et migrer vers le site tumoral afin de reconnaitre spécifiquement la cellule

tumorale et la lyser. Avec le vieillissement du système immunitaire, ce mécanisme est défaillant [137]. Premièrement, il existe des altérations des fonctions d'identification de l'antigène tumoral par la cellule présentatrice d'antigène. Deuxièmement, de par la restriction du répertoire T, la reconnaissance et l'activation du LT sont moins efficaces. Une diminution des capacités de migration vers le site tumoral est également décrit. Enfin, le LT sénescent a des capacités cytotoxiques et de prolifération moindres. Ainsi, le contrôle tumoral par le système immunitaire est moins efficace et permet l'expansion de la tumeur. Parmi les stratégies thérapeutiques anti-tumorales, l'immunothérapie ciblée se développe depuis plusieurs années en oncologie. Ainsi les anti-PD1 et anti-CTLA4 (inhibiteurs de corécepteurs des LT) ont leur place dans le traitement de certains cancers comme le cancer pulmonaire non à petites cellules et le mélanome [138]. Il existe peu d'étude sur l'efficacité de ces traitements dans la population âgée. Les analyses de sous-groupe semblent montrer que l'efficacité et la tolérance de ces traitements sont similaires à la population jeune [139, 140]. Cependant, ils convient de prendre ces résultats avec précaution au vu du « jeune » âge de ces patients (moins de 75 ans) et d'une population très sélectionnée (très peu comorbide, non polymédiquée, non fragile).

4.4 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la plus fréquente des pathologies neurodégénératives et touche plus de 40 millions de personnes à travers le monde. Elle touche essentiellement les personnes de plus de 60 ans et sa prévalence augmente avec l'âge [141]. Cliniquement, elle se traduit en premier lieu par des troubles de la mémoire puis atteint progressivement d'autres champs de la cognition telle que les phasies, les gnosies, les praxies et les fonctions exécutives. Physiopathologiquement, elle se

traduit par la constitution de plaques amyloïdes composée de protéine Aβ et d'une dégénérescence neurofibrillaire liée à l'accumulation de protéine Tau hyperphosphorylée [141]. Cependant, les mécanismes exacts à l'origine de cette maladie sont mal connus. Le système immunitaire joue un rôle important. L'état hyperinflammatoire existant au niveau systémique (« inflam-aging ») existe également au niveau du système nerveux central (« neuro-inflam-aging »). Avec l'âge, la barrière hémato-encéphalique devient plus perméable permettant le passage de nombreuses cellules immunitaires (monocytes, macrophages, LT, LB) du sang vers le parenchyme cérébral. Ces cellules activées produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF-α. Cette hyperinflammation induit l'activation des astrocytes et de la microglie créant une inflammation locale et entrainant la production de ROS. Ces phénomènes contribuent à l'accumulation de peptides Aβ qui participent eux-mêmes à l'entretien du phénomène inflammatoire [142].

8. Interventions cliniques pour un vieillissement en bonne santé

Un modèle intéressant de vieillissement réussi est celui des centenaires, dont l'étude des facteurs associés à cette longévité pourrait être une piste dans la recherche de thérapeutique ciblée. En 2008, une étude menée sur une cohorte de centenaires a montré la présence de variants génétiques dans la séquence codante de l'IGF-1R conduisant à une voie de signalisation IGF défectueuse, impliquée dans leur longévité [143]. Une autre étude a confirmé l'apparition de polymorphismes dans le gène FOXO3a associés à la longévité des patients [144]. Récemment, en 2016, en réalisant le génotype des « single-nucleotide polymorphism » (SNP), les auteurs ont identifié des polymorphismes SIRT6 (sirtuine) associés à la longévité humaine [145]. L'ensemble du séquençage des exons a permis d'améliorer la caractérisation et

l'identification des gènes associés à la longévité en bonne santé [146]. Hormis leurs spécificités génétiques, les centenaires présentent un phénotype immunitaire particulier. La cohorte des centenaires italiens a révélé un profil immunitaire hautement conservé (nombre plus élevé de cellules T naïves et de cellules mémoire fonctionnelles avec une diversité de répertoires de lymphocytes T conservée). Leur nombre de cellules B est maintenu avec un titre d'IgM accru, ce qui suggère une meilleure capacité de réponse à une nouvelle stimulation antigénique. De plus, leur activité métabolique est favorable avec une voie de l'insuline efficace [147] et une résistance au stress oxydatif [148], maintenant un équilibre entre l'environnement pro et anti-inflammatoire [148].

De nos jours, il n'existe pas d'intervention médicale ciblant le vieillissement faute de biomarqueurs spécifiques [113]. Parmi les pistes potentielles d'interventions anti-âge, la restriction calorique (RC) a été proposée en raison de son effet bénéfique sur le stress oxydatif et de son effet anti-inflammatoire. Dans les modèles animaux, plusieurs études ont conclu à un effet positif de la RC sur la mortalité, l'autonomie fonctionnelle et plusieurs maladies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la cardiomyopathie [149]. Un essai clinique (étude CALERIE) a été conduit sur 220 adultes en bonne santé afin d'évaluer l'impact de la RC sur le vieillissement chez l'homme. Un effet positif de la RC est retrouvé sur 2 algorithmes biologiques de vieillissement [150]. Cependant, ces résultats sont difficilement extrapolables au sujet âgé polypathologique du fait du design de cet essai clinique (âge moyen : 38 ans, sujets en bonne santé). De plus, la dénutrition qui est fréquente chez les personnes âgées, et connue pour être associée à la mortalité et à la fragilité [151, 152].

Les études interventionnelles ciblant le processus de vieillissement humain et les maladies liées à l'âge sont en constante augmentation (résumées par Longo VD. *et al*. [153]). Ces stratégies, basées sur des études menées majoritairement chez les rongeurs, chez la levure *Saccaromyces cerevisiae* ou chez le nématode *C. Elegans*, visent principalement :

a) l'alimentation afin de limiter l'apport calorique (jeûne) ou l'apport protéique
b) l'inhibition de l'axe GH/ IGF-I (2-deoxy-D-glucose ; pegvisomant)
c) l'inhibition de la voie mTOR-S6K (rapamycine)
d) l'activation de la voie AMPK et des sirtuines (flavones, anthocyanines, metformine)

Chez l'homme, il existe peu d'essais cliniques ayant évalué l'efficacité de ces traitements. Nous pouvons énumérer de manière non exhaustive, l'utilisation de la rapamycine (agent pharmacologique connu utilisé en transplantation et en oncologie), qui inhibe spécifiquement mTOR en créant un complexe tri-moléculaire entre mTOR kinase et la proteine FKBP. Son utilisation a conduit à l'amélioration des réponses vaccinales vis-à-vis du virus de la grippe [154]. En revanche, elle n'a pas d'effet significatif sur l'état cognitif et fonctionnel des patients [155]. De plus, la rapamycine a de nombreux effets indésirables, entre autres de dérégulation métabolique (hyperglycémie, hyperinsulinemie, résistance à l'insuline [156]), ce qui limite son déploiement comme thérapie anti-âge.

Dans d'autres essais, l'utilisation de la metformine chez les adultes à haut risque de diabète de type 2 montre une incidence réduite de facteurs de risques cardio-vasculaires [157] et de maladies liées à l'âge tel que les cancers [158] et le déclin cognitif [159]. Sur la base de ces observations, la FDA vient d'approuver que la metformine puisse être testée sur la santé globale chez les personnes âgées et la

première étude en cours nommée TAME (vieillissement ciblé avec la metformine) pourrait être le premier pas vers le développement de médicaments anti-âge efficaces.

En outre, certaines interventions nutritionnelles ont été suggérées comme des agents anti-inflammatoires prometteurs et pourraient même jouer sur les réponses inflammatoires au stress [160, 161].

A ce jour, de nombreuses pistes thérapeutiques sont proposées dans la littérature scientifique, avec des résultats très encourageants dans les modèles animaux. Il est encore impossible de conclure sur l'efficacité de ces thérapeutiques chez l'homme en raison du faible nombre d'essais cliniques publiés (tableau 4).

Tableau 4 Principaux essais cliniques et études chez l'homme portant sur l'impact des thérapeutiques antivieillissement. D'après *Vallet et al. Rev Med Interne 2019*

Auteur	Thérapeutique utilisée	Mode d'action	Type d'étude	Population étudiée	Principaux résultats
Mannick *et al.*, 2014	Rapamycine	Inhibition de la voie mTOR	Randomisée contre placebo	218 patients Age ≥65 ans	37 % d'effets secondaires Amélioration des réponses vaccinales antigrippales, Réduction du % de lymphocytes T exprimant PD-1
Kraig *et al.*, 2018	Rapamycine	Inhibition de la voie mTOR	Randomisée contre placebo	25 patients Age moyen 80 ans	Bonne tolérance Pas de différence significative entre les 2 groupes à 8 semaines en termes de profil immunologique (sous-types cellulaires et profil cytokinique) et de résultats cliniques (état cognitif et fonctionnel)
Belsky *et al.*, 2017	Restriction calorique		Randomisée contre 1 groupe témoin sans restriction calorique	220 patients, Age moyen 38 ans	Vieillissement biologique significativement ralenti dans le groupe « restriction calorique »
Abbasi *et al.*, 2004	Metformine	Activation de la voie AMPK	Étude cas-témoin	31 patients, Diabète type 2 sous régime seul ou sulfamide en monothérapie, Age moyen 58 ans	Diminution significative du taux plasmatique de glucose, de triglycéride et d'acide gras libre sous Metformine
Ng *et al.*, 2014	Metformine	Activation de la voie AMPK	Étude de cohorte	367 patients diabétiques, Age moyen 67 ans	Les patients traités par metformine étaient moins à risque de développer des troubles cognitifs que les patients non traités
Turner *et al.,* 2015	Resveratrol	Activation de SIRT1 (voie des sirtuines)	Randomisée contre placebo	119 patients atteints de maladie d'Alzheimer Age moyen 72 ans	Bonne tolérance du traitement Diminution plus importante de l'Aβ sanguine et dans le LCR dans groupe placebo
Huhn *et al.,* 2018	Resveratrol	Activation de SIRT1 (voie des sirtuines)	Randomisée contre placebo	60 patients Age moyen 67 ans	Pas d'amélioration significative de la mémoire sous resveratrol

mTOR : mechanistic target of rapamycin ; PD-1 : programmed cell death protein 1 ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; LCR : liquide céphalorachidien

PARTIE III : Stress aigu, impact sur le système immunitaire

1. Généralités

Le stress peut se définir comme une réponse physiologique de l'organisme à une agression quelle qu'elle soit. Cette réponse peut être transitoire si l'agression est de courte durée (stress aigu) ou prolongée (stress chronique).

Les systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire interagissent entre eux pour répondre de manière adaptée et efficace au stress [162] (Figure 5). Il existe peu de données à l'heure actuelle mais il semblerait qu'à la phase précoce (dans les premières heures) le stress induise une réponse pro-inflammatoire alors qu'à plus long terme cette réponse serait plutôt anti-inflammatoire. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est la principale voie par laquelle interagissent les 3 systèmes. En effet, lorsque l'organisme est soumis à un stress, l'hypothalamus sécrète sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, Il-1β, IL-6) du corticotropin-releasing-factor (CRF). Le CRF induit la sécrétion d'« adrenocorticotropin hormone » (ACTH), d'hormone de croissance et de prolactine par l'hypophyse. L'ACTH stimule la glande surrénale entrainant la production de catécholamines (adrénaline, noradrénaline) et de glucocorticoïdes (GC), autrement appelées « hormones de stress ». Ces hormones vont pouvoir se fixer sur les récepteurs de surface de différents types cellulaires (leucocytes, monocytes, macrophages, lymphocytes, cellules NK), et ainsi moduler leur activité [162, 163]. Les GC inhibent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et induisent une différenciation Th2 au détriment des Th1 tout comme les catécholamines. La CRH induit la production d'IL-1β par les monocytes, la sérotonine module la synthèse d'IFN-γ par les cellules NK et enfin la prolactine favorise l'expansion clonale des cellules lymphoïdes [162]. Ils existent de nombreux

mécanismes de rétrocontrôle. L'IL-1β entraine une inhibition de la production de « corticotropine-releasing hormone » (CRH) par l'hypothalamus et donc d'ACTH par l'hypophyse [162]. De plus, les GC exercent ensuite un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus afin d'inhiber la sécrétion d'hormones de stress. Les GC agissent également directement sur les cellules du système immunitaire en se fixant à leurs récepteurs cytosoliques (Glucocorticoid receptor ; GR). Le complexe ainsi formé active la transcription de gènes codant pour des protéines anti-inflammatoires tels que l'Annexine A1, le Glucocorticoid-Induced Leucin Zipper (GILZ) et l'uncoupling protein-2 (UCP-2) [164]. L'UCP-2 a la particularité d'inhiber la production de ROS au sein de la mitochondrie. Il a été récemment montré l'existence de GR au niveau mitochondrial. Les GC en s'y fixant, induisent la biosynthèse de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative. Ils jouent également un rôle dans la régulation du potentiel de membrane de ces mitochondries, et dans l'homéostasie de leurs pompes calciques. Les glucocorticoïdes vont également former un complexe avec NFkB afin d'inhiber la transcription de gènes codants pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β et TNFα) [164].

Le dérèglement de l'interaction entre le système nerveux et endocrinien peut donc avoir un impact sur les réponses immunitaires. De nombreux événements cliniques peuvent être considérés comme des facteurs de stress aigus tels que le sepsis ou la fracture de l'extrémité supérieure du fémur. Ces événements, fréquents chez le sujet âgé, sont associés à un mauvais pronostic vital et fonctionnel.

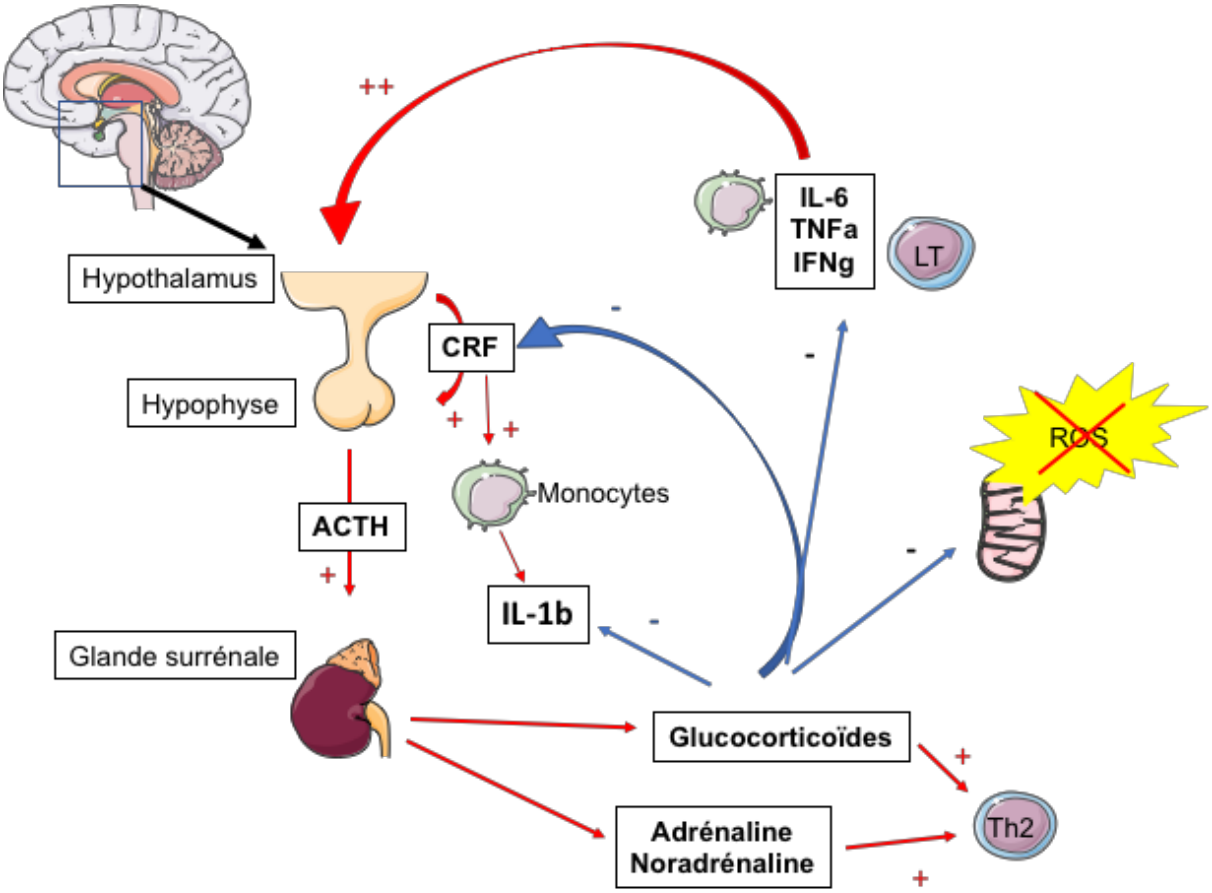


Figure 5: Schéma de synthèse des interactions entre le système neuroendocrinien et immunitaire au cours d'un stress aigu. Le stress et les cytokines pro-inflammatoires entrainent la production de CRF par l'hypothalamus, qui stimule l'hypophyse afin de produire de l'ACTH. Le CRF stimule également directement les monocytes pour la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. L'ACTH entraine la sécrétion d'hormones du stress (glucocorticoïdes, noradrénaline, adrénaline) par les glandes surrénales. Ces hormones vont entraîner d'une part une différenciation lymphocytaire Th2 et d'autre part inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires et de ROS par les mitochondries.

2. Modèle de stress aigu : la fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF)

2.1 Aspects cliniques

La fracture de l'extrémité supérieure du col fémoral (FESF) représente un véritable problème de santé publique en France et dans le monde. Il s'agit d'une pathologie fréquente notamment dans la population âgée et elle est associée à un pronostic vital et fonctionnel défavorable. Elle engendre également un coût économique et sociétal important.

2.1.1 Définitions, type de fracture et traitement chirurgical associé

On distingue schématiquement 2 types de FESF : les fractures du col fémoral qui sont intra articulaires et touchent l'os cortical et les fractures trochantériennes qui sont extra-articulaires et touchent l'os spongieux. Les fractures du col sont classées (classification de Garden) en fonction du degré de déplacement de la fracture. Les fractures trochantériennes quant à elles sont classées en fonction de la localisation du trait de fracture. Leur pronostic est identique mais leur prise en charge chirurgicale est différente. En effet, dans les fractures du col fémoral, la prothèse intermédiaire ou totale de hanche reste l'option chirurgicale privilégiée, notamment en cas de déplacement important de la fracture (Garden III ou IV). Au contraire, les fractures trochantériennes relèvent d'une ostéosynthèse par vis-plaque (DHS) ou clou gamma [165].

2.1.2 Epidémiologie

A travers le monde, 1,6 million de personnes souffre d'une FESF chaque année [166]. En France, l'incidence annuelle est supérieure à 60 000 cas [167]. Cette pathologie a la particularité d'être deux fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes [167]. De plus, elle touche principalement les sujets âgés : plus de 80% des patients ont plus de 75 ans [168] et l'incidence est multipliée par 20 après 85 ans [167].

Sur le plan économique, cette pathologie représente un coût important. L'assurance maladie a estimé le coût des FESF à 475 millions d'euros pour l'année 2009 [169]. Ce chiffre est probablement sous-estimé puisqu'il ne se base que sur les données de la tarification à l'activité (T2A) à la phase aigüe. Il ne comprend ni le prix de la prothèse, ni les soins liés à la rééducation du patient, ni les frais engendrés par d'éventuelles complications secondaires.

2.1.3 Facteur de risque et étiologies des FESF

Le principal facteur de risque de FESF est l'ostéoporose, qui se caractérise par une diminution de la densité osseuse [170]. L'ostéoporose débute souvent à la ménopause chez les femmes et plus tardivement chez les hommes (d'où une incidence plus importante de FESF chez les femmes). Plus la densité osseuse est faible, plus le risque de FESF est grand [171]. Le mécanisme le plus fréquent de survenue de la fracture est un traumatisme de faible cinétique : la chute de sa hauteur [172]. Les patients âgés sont plus à risque de chute que les plus jeunes et les patients chuteurs sont eux même les plus à risque de chute, entrainant un véritable cercle vicieux.

2.1.4 Conséquences d'une FESF

Autonomie et qualité de vie

Les patients qui survivent à une fracture du col fémoral se retrouvent souvent confrontés à une perte d'autonomie fonctionnelle. Cette perte d'autonomie se retrouve aussi bien dans l'échelle des activités de la vie quotidienne (ADL) que dans l'échelle des activités instrumentales (IADL) [173]. Elle est maximale la première année qui suit la fracture puis tend à se stabiliser mais environ 50% des patients ne retrouvent pas leur autonomie antérieure [173, 174] . Ainsi par exemple, à un 1 an, 90% des patients survivants qui étaient autonomes avant la fracture éprouvent des difficultés à monter un escalier, 50% ont des difficultés à marcher sans aide et 40% ne peuvent plus réaliser leurs courses seuls [173].

Plusieurs facteurs de risque de perte d'autonomie fonctionnelle sont identifiés, tels que l'autonomie antérieure, le taux de comorbidité, l'âge, le nombre de jour de confusion ou le nombre de jours que le patient a passé au lit sans mobilisation [174].

Associé à cette perte d'autonomie, les patients survivants sont la plupart du temps sujets à une diminution de leur qualité de vie à court et long terme (18 mois) [175–178].

Mortalité

Les FESF sont associées à une augmentation de la mortalité, aussi bien à court qu'à long terme. Le taux de mortalité varie en fonction des études de 9% à 10%, à 30 jours [179, 180] et de 20% à 30% à 1 an [180–182]. La mortalité à 5 ans est estimée à 60% et dépasse 70% après 80 ans [181].

Une méta-analyse publiée en 2010, incluant 24 études prospectives pour un total de 578 436 femmes et 154 276 hommes, a étudié l'impact des FESF sur la mortalité [166].

A 3 mois, le risque de mortalité est multiplié par plus de 5 (HR, 5,75 [CI : 4,94 à 6,67]) pour les femmes et par 8 (HR, 7,95 [6,13 à 10,30]) pour les hommes. Cette augmentation du risque de mortalité décroit progressivement sur 2 ans mais reste supérieur au taux de mortalité observé chez les patients contrôles appariés pour l'âge et le sexe, y compris à très long terme (10 ans). A court et à long terme les hommes sont plus à risque de mortalité que les femmes.

Facteurs de risque de mortalité

L'âge apparait comme l'un des principaux facteurs de risque de mortalité après une FESF. Le taux de mortalité intra-hospitalier, de mortalité à 30 jours et de mortalité à 1 an est multiplié par 2 à chaque décade [168, 180, 183]. Il est jusqu'à 4 fois plus important à long terme chez les patients âgés de 80 ans et plus (RR : 4,03 [1,48-11,00]) [184].

Le sexe masculin est également un facteur de risque de mortalité intra-hospitalière, de mortalité à 3 mois, 1 et 3 ans [185]. Un an après une FESF, les hommes ont 1,5 à 2,5 fois plus de risque de mortalité que les femmes [180, 185, 186].

Les comorbidités des patients sont également un facteur de risque de surmortalité après une FESF. En effet, à 1 an 28% des patients présentant au moins 1 comorbidité étaient décédés contre 7% des patients sans comorbidités [184]. Les patients présentant plus de 2 comorbidités ont un risque de mortalité 1,65 fois plus élevé que les autres [186]. Le nombre de comorbidités est corrélé au risque de décès à 30 jours et à 1 an [180]. Les comorbidités les plus souvent associées à une augmentation du risque de mortalité sont les cancers, l'insuffisance rénale chronique, l'insuffisance respiratoire chronique, l'insuffisance cardiaque chronique et la fibrillation atriale [180]

Les complications post-opératoires sont également un facteur de risque de mortalité. D'après une étude française sur 6860 patients, les évènements cardio-vasculaires sont la principale cause de décès à 6 mois post opératoire d'une FESF (26,8%). Les infections pulmonaires représentent 5,5% des décès et les complications thromboemboliques 3,9% [187]. Dans l'étude de Roche *et al*., la survenue d'une complication cardiaque en post-opératoire augmente le risque de décès par 8 [5,5-11,6] à 3 mois et par 5 [3,9-6,5] à 12 mois [180]. Les infections pulmonaires et les évènements thromboemboliques veineux augmentent le risque de décès respectivement par 3,0 [2,1-4,2] et 4,5 [2,7-7,6] à 3 mois et par 2,4 [1,9-3,0] et 2,1 [1,4-3,1] à 12 mois [180].

Enfin, l'autonomie fonctionnelle avant la FESF est également un facteur influent sur la mortalité. En effet les patients institutionnalisés avant la fracture ont 2 fois plus de risque de mortalité (HR 2,0 [1,1-3,9]) que les patients vivant à domicile [188]. De plus, les patients présentant des capacités fonctionnelles réduites (évaluées par l'indice fonctionnel HAQ « Health Assessment Questionnaire ») ont une augmentation de 50% du risque de mortalité (HR 1,5 [1,1-2,1] [188].

2.2 Immunité et FESF :

Plusieurs études mettent en évidence des modifications du système immunitaire après une FESF, suggérant un rôle important de l'immunité dans l'évolution des patients. Les neutrophiles subissent une diminution transitoire de leur fonction de chimiotactisme et de phagocytose ainsi qu'une diminution de l'expression de CD16, une activation des voies de signalisation NFKB et PI3K et une inhibition de la NADPH oxydase pouvant impacter l'évolution clinique des patients [189]. De plus, les 3 sous-types de monocytes (classiques, intermédiaires et non conventionnels) subissent plusieurs altérations de

leurs phénotypes et de leurs fonctions, notamment des monocytes non conventionnels. Leur fonction phagocytaire et leur production de superoxyde sont altérées, leur production de TNF-α augmente et leur production d'IL-10 diminue par rapport aux contrôles sains [189]. Ces résultats suggèrent un état pro-inflammatoire intense et transitoire après une fracture de la hanche. L'importance de cette inflammation, reflétée par les taux de cytokines pro-inflammatoire (IL-6, TNF-α, IL-10) et la procalcitonine, est associée au pronostic des patients et notamment à mortalité à long terme [190, 191] . De plus, des taux plus élevés d'IL-6 et d'IL-1β sont retrouvés chez les patients présentant une confusion post-FESF comparativement aux contrôles [192, 193]. Une publication récente de notre équipe a montré que les taux plasmatiques de néoptérine, une molécule produite par les macrophages et les monocytes sous l'influence de l'IFN-γ, sont prédictifs de mortalité à un an d'une FESF chez les personnes âgées. De plus, la néoptérine, mesurée à l'arrivée à l'hôpital, est corrélée négativement au temps de survie après la chirurgie [194]. Il est intéressant de noter que la voie conduisant à la production de néoptérine est couramment utilisée pour la synthèse de la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH4), essentielle à la synthèse de la dopamine et de la sérotonine, deux hormones impliquées dans les réponses au stress.

3.La néoptérine

3.1 Synthèse

La néoptérine (1', 2', 3' -D-erythro-trihydroxypropylpterine) est une molécule de la famille des ptéridines. Elle a pour précurseur le guanosine triphosphate (GTP) qui est transformée en 7,8-dihydroneopterine triphosphate sous l'action de la GTP-cyclohydrolase I. La 7,8-dihydroneopterin triphosphate est l'élément commun de la voie de production de la néoptérine et de la tetrahydrobiopterine (BH4). Sous l'action

de phosphatases, la 7,8-dihydroneopterine triphosphate est transformée en 7,8-dihydronepterine. Celle-ci subit alors des phénomènes d'oxydations conduisant à la formation de 7,8-dihydroxanthopterine (forme inactive) sous l'action de radicaux peroxylés et/ou hydroxylés ou à la formation de néoptérine sous l'action du superoxyde hypochlorite (Figure 6) [195]. En revanche, sous l'action de la 6-pyrovoyltetrahydropterin synthétase, on aboutit à la production de 6-pyrovoyltetrahydropterin puis de BH4 via des mécanismes de réduction NADPH dépendant. La BH4 est la voie commune de production du tryptophane, de l'oxyde nitrique synthétase (NOS), de la phénylalanine et de la tyrosine hydroxylase. Elle est donc respectivement impliquée dans la production de citruline, monoxyde d'azote, sérotonine, tyrosine, et dopamine [196].

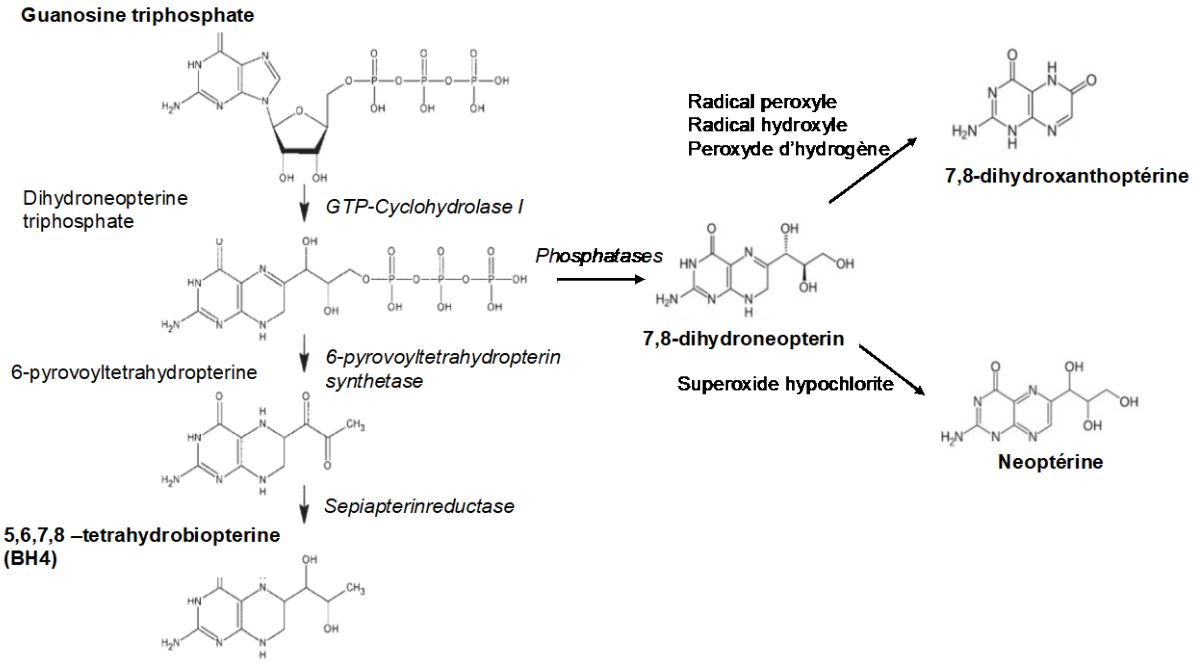


Figure 6 : Voies de formation de la néoptérine. La néoptérine a pour précurseur la Guanosine triphosphate (GTP). Sous l'action de la GTP-Cyclohydrolase puis de différentes enzymes (synthétases, réductases et phosphatases) la GTP est progressivement transformée soit en 5,6,7,8-tetrahydrobiopterine (BH4) soit en 7,8 dihydroneopterine. Sous l'action de radicaux libres la 7,8 dihydroneopterine est transformée en néoptérine. D'après *Hoffman et al. Inflamm. Res 2003 et Gieseg et al. Antioxydants 2018*

La néoptérine est produite par les monocytes et les macrophages sous l'influence de l'IFN-γ. Elle nécessite donc une activation préalable du système immunitaire T et plus spécifiquement de la voie Th1 ou des cellules NK (Figure 7). D'autres stimuli tels que le l'interféron alpha et béta, lipopolysaccharide (LPS) ou la concavaline A ont été rapportés et utilisés *in vitro* comme des inducteurs de néoptérine. De façon intéressante, le TNF-α qui est également produit par les monocytes, ne suffit pas seul à induire la production de néoptérine mais il amplifie l'action de l'IFN-γ [196].

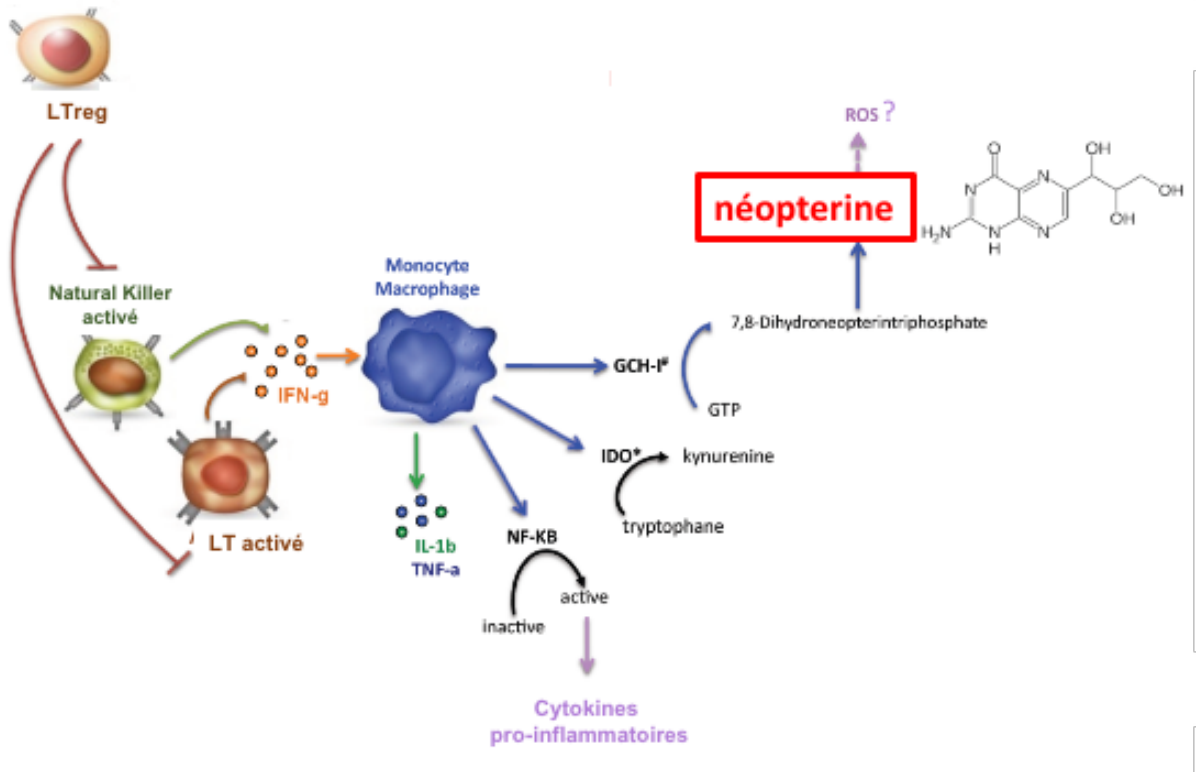


Figure 7 : Voies d'induction de la néoptérine. Sous l'influence de l'interferon gamma (IFN-γ) sécrété par les cellules du système adaptatif, les monocytes et macrophages synthétisent de la GTP cyclohydrolase de type I (GCH-I) catalysant la transformation de la Guanosine triphosphate (GTP) en 7,8-Dihydroneopterintriphosphate. Cette dernière est transformée en néoptérine par différents mécanismes de déphosphorylation et d'oxydation. Le rôle de la néopterine sur le stress oxydatif reste encore méconnu et controversé. *(IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase; Il-1β : interleukine 1 béta; TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha)*

3.2 Mode d'action

La 7'8-dihodroneopterine a une action antioxydante reconnue. *In vitro*, elle maintient l'activité de la gluthatione inhibant ainsi l'acide hypochloreux (HOCl) et l'induction de la mort cellulaire [197]. Elle capte les résidus du stress oxydatif (radicaux hydroxyle et peroxyle, et HOCl) protégeant ainsi la cellule de leurs actions délétères [198–200]. Elle joue également un rôle dans l'inhibition de la peroxydation des lipides [201].

Dans ce contexte, une élévation du taux de néoptérine n'est que le reflet de la mise en route d'un mécanisme antioxydant, et en fait ainsi un biomarqueur intéressant. Cependant le rôle propre de la néoptérine est encore controversé et mal connu. Il semble qu'elle ait une action sur le stress oxydatif. En effet, elle amplifierait l'effet cytotoxique des résidus du stress oxydatif (ROS) et des résidus nitrogènes (RNS) potentiellement en inhibant la synthèse d'acide folique [202] ou en induisant une augmentation du taux intra-cellulaire de calcium [203]. *In vitro*, la stimulation de cellules musculaires lisses vasculaires (vascular smooth muscle cells, VSMC) par de la néoptérine induit l'expression du gène du nitric oxyde synthetase (iNOS), de l'oxyde nitrique (NO) [204] et de NFκB [205] participant à la production de ROS. Enfin, la néoptérine induirait la production d'oxygène singulet, de radicale hydroxyle et d'oxyde nitrique par les polynucléaires neutrophiles en culture [206].

D'autres travaux suggèrent un effet anti-oxydant de la néoptérine. En effet, une étude a montré qu'elle inhibait la production de supeproxyde par la NADPH oxydase au sein des macrophages de rats [207].

3.3 Implications cliniques

La néoptérine se retrouve dans les différents fluides corporels et peut se doser dans le sérum, la salive, les urines et le liquide céphalo-rachidien. Elle est excrétée par les reins et sa demi-vie est de 90min. Chez l'homme sain, les concentrations plasmatiques standards sont comprises entre 1 et 9nM [196].

De nombreuses pathologies sont associées à une élévation des taux sériques de néoptérine telles que le sepsis [208], les cancers [209], les pathologies auto-immunes [210] et l'athérosclérose [211]. Chez le sujet âgé sain, de nombreuses études ont montré une élévation du taux de néoptérine comparativement aux sujets jeunes [212]. Chez les nonagénaires, elle aurait même une valeur pronostic, un taux élevé étant associé à une espérance de vie plus courte [213].

4. Le stress oxydatif

4.1 Mécanismes généraux

Le stress oxydant (ou oxydatif) est un mécanisme correspondant à l'agression des cellules et de l'organisme par des radicaux libres appelés Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO ou ROS). Ces radicaux libres sont produits naturellement par la cellule au cours des réactions de phosphorylation oxydative à l'origine de la production d'énergie (Adénosine Tri Phosphate ou ATP). Des mécanismes de régulation antioxydants entrent alors en jeux afin d'éliminer les radicaux libres de l'organisme. Lorsque ces mécanismes sont débordés, on aboutit à un état de stress oxydatif [214]. Il existe deux sources endogènes principales de ROS qui sont la mitochondrie et les NADPH oxydases (NOX).

Au cours de la respiration mitochondriale, environ 2% de l'oxygène utilisé va être transformé en radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) par gain d'un électron. Les radicaux

superoxydes, toxiques pour la cellule, vont être pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD) afin d'être transformés en peroxyde d'hydrogène (H2O2). L'H2O2 est une molécule qui reste toxique pour l'organisme. Elle peut soit entrainer la formation de radical hydroxyle (OH.) par la réaction de Fenton (oxydation du fer ou du cuivre par l'H2O2) soit être dismutée en eau (H20) par une enzyme appelée catalase, soit être réduite en glutathion sous l'action de la glutathion peroxydase (GPx) [214].

Les NOX catalysent la réduction de l'oxygène en utilisant le NADPH comme donneur d'électron, entrainant ainsi la formation de radical superoxyde (Figure 8)

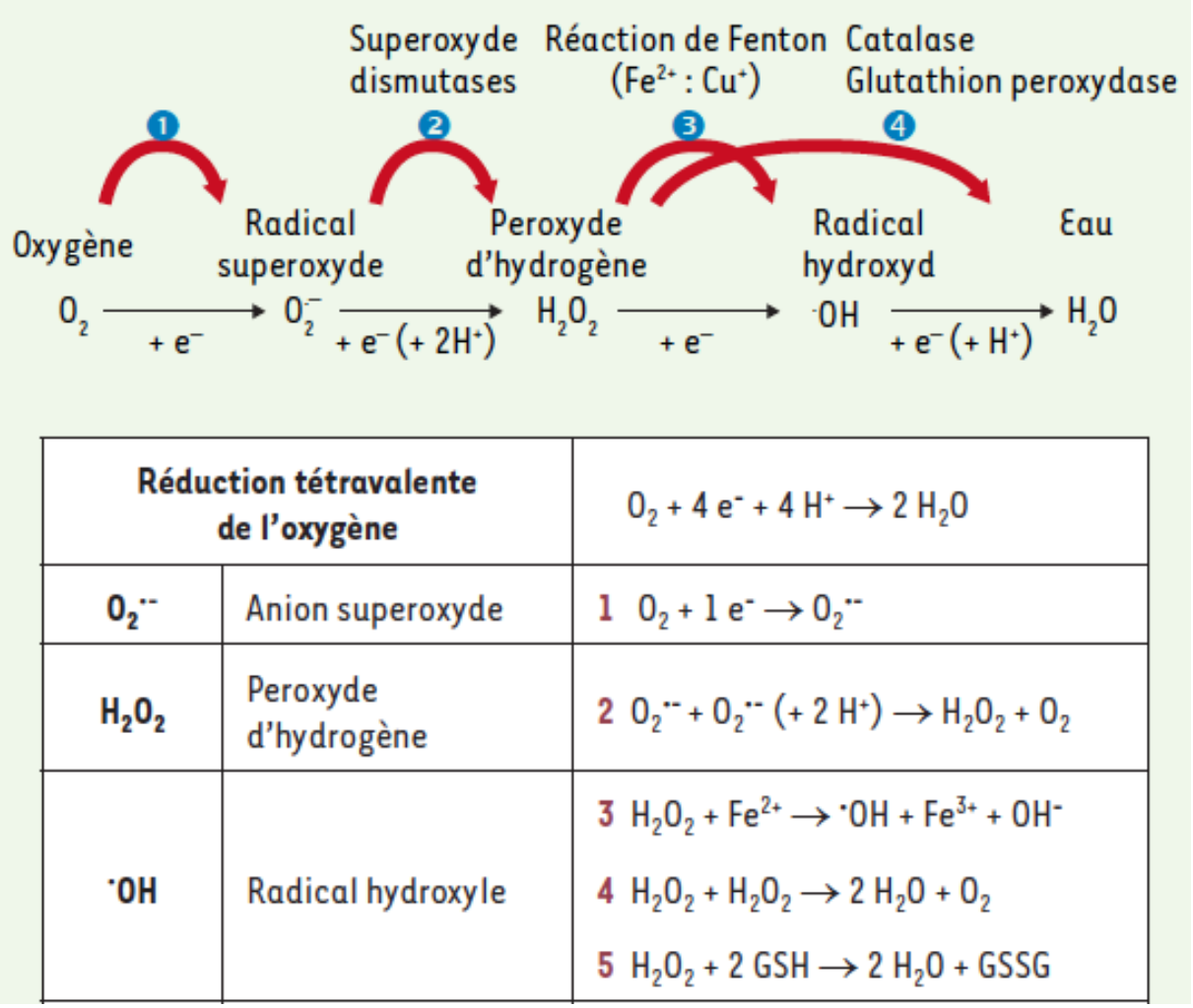


Figure 8 : Formation des espèces réactive de l'oxygène. L'oxygène est réduit suivant plusieurs étapes aboutissants à la formation d'anion superoxyde, de peroxyde d'hydrogène puis de radical hydroxyle. D'après *Migdal C et a. Médecine sciences 2011*.

Il existe de nombreux types de NOX (NOX 1, 2, 3, 4, 5) qui diffèrent par leur stimuli, leur localisation et leur fonction. NOX 2 par exemple se retrouve dans les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, macrophages, monocytes) et joue un rôle important dans la phagogytose, l'apoptose et la nécrose [214].

A noter qu'il existe également des sources exogènes métabolisées par l'organisme comme radicaux libres parmi lesquels le tabac, la pollution atmosphérique, les radiations ou certains solvants [215].

Les ROS ont une action oxydante sur la plupart des macromolécules de l'organisme. Ils peuvent oxyder les chaines latérales des acides aminés, entrainer une béta-oxydation des acides gras, entrainer une glycation non enzymatique des protéines ou encore entrainer des lésions mutagènes de l'ADN [214, 215].

4.2 Stress oxydant et vieillissement

Il existe de nombreuses études, montrant que le vieillissement s'accompagne d'une augmentation des phénomènes oxydatifs et d'une diminution des capacités antioxydantes de l'organisme.

Au niveau cellulaire, l'accumulation de ROS est associé à l'apparition d'un phénotype de sénescence cellulaire incluant [216] :

- l'activation de la voie mTOR,
- la production d'IL-1a induisant la voie NFκB,
- l'induction de l'expression de métalloprotéases,
- l'inhibition de FOXO impliqué dans la protection du stress oxydant,
- des anomalies du métabolisme calcique au niveau du réticulum endoplasmique
- l'inhibition de l'activité des sirtuines impliquées dans le métabolisme et la survie cellulaire ainsi que dans les réparations de l'ADN.

- le raccourcissement des télomères [217].

Enfin, les ROS agissent sur les cellules souches en diminuant leur capacité d'autorenouvellement, en diminuant leur nombre et en altérant leur fonction [218].

Dans les modèles animaux, la production de radical superoxide et le taux de peroxydation des lipides dans différents tissus du rat augmente au cours du vieillissement [219]. De même la production d'H2O2 augmente et les dysfonctions mitochondriales s'accumulent avec l'âge chez la Drosophile [220].

4.3 Pathologies liées au vieillissement et stress oxydatif

De nombreuses pathologies associées au vieillissement ont un lien avec le stress oxydatif. Ainsi, les pathologies cardiovasculaires sont associées à une diminution de la tolérance de l'organisme au stress oxydant en lien avec la diminution du taux d'antioxydant (comme la SOD) au cours du temps [221]. De plus, les ROS induisent des lésions endothéliales en diminuant la synthèse d'oxyde nitrique (vasodilatateur),en augmentant l'inflammation locale et en favorisant le peroxydation des lipides [222]. Le LDL cholestérol oxydé (oxLDL) favorise le développement de l'athérosclérose par plusieurs mécanismes [222] : recrutement de monocytes et macrophages dans la paroi vasculaire, prolifération et apoptose des cellules musculaires lisses, stimulation de l'adhésion plaquettaire à la paroi.

Au cours de la maladie d'Alzheimer, il a été montré des dysfonctions mitochondriales à l'origine d'une production anormale de ROS qui participent à l'accumulation de peptides Aβ, à une hyperphosphorylation de la protéine Tau et engendrent des dysfonctions synaptiques notamment au niveau des récepteurs au glutamate [223].

Le stress oxydant joue également un rôle dans la carcinogénèse. Les ROS induisent la voie de transcription NKκB promulguant ainsi la prolifération tumorale et des

mécanismes anti-apoptotiques. Ils favorisent localement l'angiogénèse et entrainent des lésions mutagènes en oxydant directement l'ADN cellulaire [224].

Au cours de la fracture du col fémoral, il a été montré une élévation du taux de peroxydation des lipides (reflet du stress oxydant) comparativement aux contrôles sains, d'autant plus chez les patients de plus de 65 ans. De plus, le groupe contrôle âgé présentait un taux basal de SOD-1 supérieur au groupe contrôle jeune. Cependant après la fracture, seuls les patients jeunes présentaient une élévation significative du taux de SOD-1, suggérant que les patients âgés n'étaient plus en capacité d'induire l'expression de cette enzyme inhibitrice dans les suites du traumatisme [225].

5. La reprogrammation monocytaire

5.1 Généralité

La reprogrammation du système immunitaire est un processus d'adaptation au stress de découverte récente. Dans le sepsis, deux phases ont été décrites :

- la première est un état pro-inflammatoire intense associé à une tempête cytokinique permettant la destruction de l'agent pathogène

-la deuxième est une phase immunosuppressive permettant de contrôler l'inflammation et de retourner à l'état homéostatique [226].

Si l'une de ses 2 phases est trop prolongée ou trop intense, les patients sont plus à risque de mortalité et/ou d'infections secondaires [226, 227]. Au cours du sepsis, le monocyte est capable de se reprogrammer pour passer d'un état pro-inflammatoire à un état anti-inflammatoire sous l'influence d'un facteur de transcription appelé HIF-1 α [228]. Ce phénomène est également appelé « tolérance aux endotoxines », « paralysie immunitaire » ou « immunotolérance » (Figure 9).

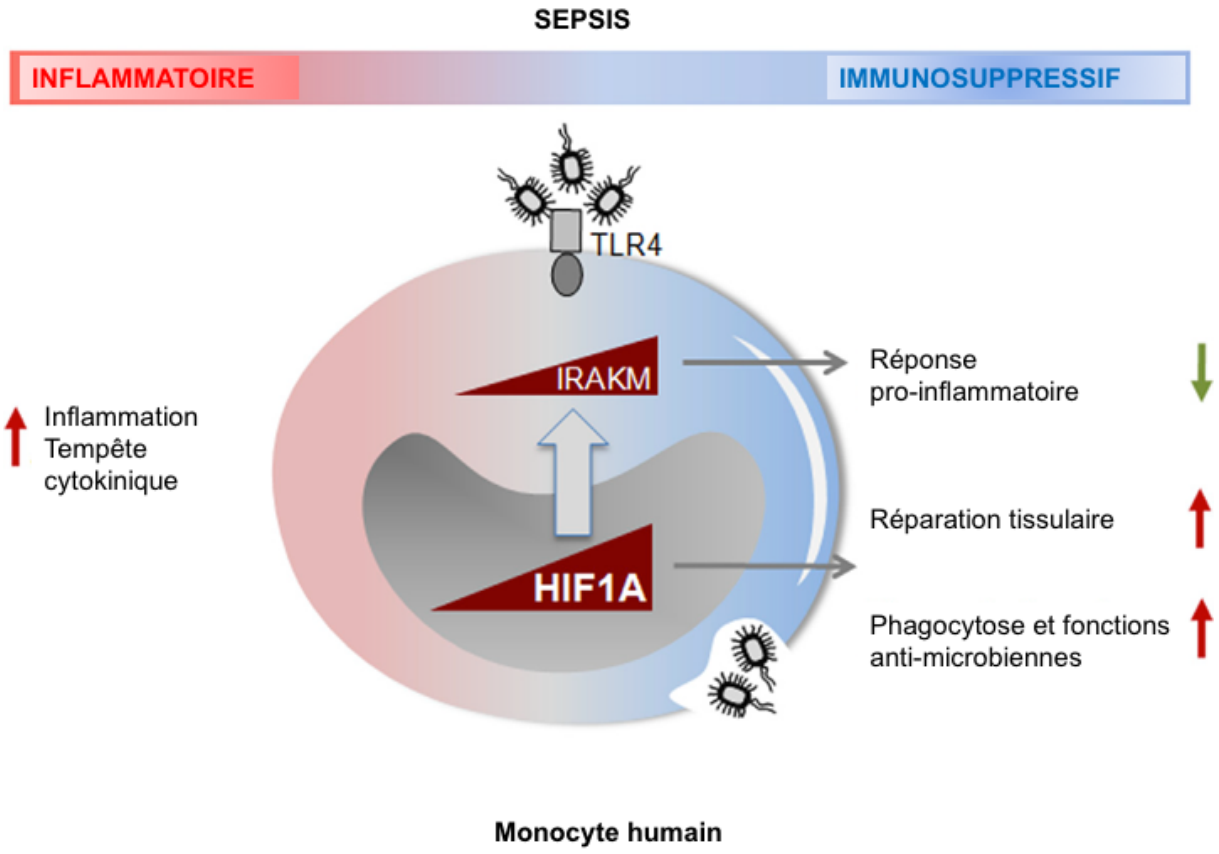


Figure 9 : Reprogrammation du monocyte au cours du sepsis. Le sepsis engendre une activation du monocyte sur un versant pro-inflammatoire intense entrainant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (tempête cytokinique). Dans les heures suivants le début du sepsis, l'activation de la voie HIF1A-IRAKM entraine une reprogrammation du monocyte qui acquière alors un phénomène suppressif. L'absence de reprogrammation du monocyte est associée à un mauvais pronostic pour le patient. D'après *Shalova et al. Immunity 2015*.

5.2 Structure, induction et régulation de de HIF-1 α

Hypoxia Inducible Factors (HIFs) est un groupe de facteurs de transcription dont l'expression est induite en condition d'hypoxie [229, 230]. Il s'agit d'hétérodimères composés d'une sous-unité béta (HIF- β) et d'une des 3 sous-unités alpha suivantes : HIF-1 α, HIF-2 α et HIF-3 α. En situation de normoxie, HIF-1α est hydroxylée rapidement par différents groupes d'enzymes tels que les oxygen-dependant prolyl hydroxylases (PHD) et les asparaginyl-hydroxylase factor-inhibiting HIF (FIH). Sous la forme hydroxylée, HIF-1α est inactif et rapidement dégradé par le protéasome. En situation d'hypoxie, PHD et FIH sont inactives permettant la dimérisation de l'unité alpha et béta, leur translocation intranucléaire et l'expression de gènes induit en réponse à l'hypoxie (HREs) [230]. De même, en situation de stress cellulaire, la Heat Shock Protein 90 (HSP90) bloque la dégradation de HIF-1α et facilite la dimérisation avec la sous-unité béta [229].

HIF-1α a pour cible plus d'une centaine de gènes impliqués dans érythropoïèse, l'angiogenèse, le métabolisme du fer, le métabolisme glucidique, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la réponse inflammatoire [230, 231]. Plusieurs voies sont impliquées dans la régulation de son expression parmi lesquelles la voie Akt/mTOR qui induit l'expression de HIF-1α [232]. NFκB induit également la transcription de HIF-1α [233] au sein des macrophages mais il existe des phénomènes de rétrocontrôle entre ces deux facteurs de transcription. Dans le neutrophile par exemple, HIF-1α induit lui-même la transcription de NFκB afin de permettre à la cellule de survivre en situation d'hypoxie [234]. Paradoxalement, sur des lignées de cellule tumorale (HeLa) stimulée par IL-1β, l'inhibition des inhibiteurs de HIF (PHD et FIH) entraine une inhibition de la voie NFκB [235]. Enfin, dans le sepsis, HIF-1α induit l'expression d'

IRAKM [228], qui est lui-même un inhibiteur de la voie des TLR au sein des monocytes à l'origine de la tolérance aux endotoxines [236].

5.3 Rôle de HIF-1α sur le système immunitaire

L'action de HIF-1α sur le système immunitaire peut être paradoxalement pro ou anti-inflammatoire en fonction du modèle cellulaire étudié, du moment de son induction et de la voie de signalisation qu'il active. Dans un modèle murin d'infection cutanée à Streptocoque, les souris knock-out (KO) pour HIF-1α au sein de leur lignée myéloïde ont des capacités de bactéricidie plus faibles révélées par un chimiotactisme altéré et une plus faible concentration de peptides antimicrobiens [237]. Dans d'autres modèles murins d'infection les souris déficientes en HIF-1α au sein des lignées myéloïdes ont une capacité moindre à produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1, TNFα) en réponse à une stimulation par le LPS ou l'acide lipoteichoïque (LTA) [238, 239]. L'ensemble de ces éléments montre l'importance de l'induction de HIF-1α dans la promotion de la réponse pro-inflammatoire au cours d'un sepsis. Au sein de la lignée lymphoïde, HIF-1α a au contraire un effet anti-inflammatoire en induisant la différenciation des LT vers un profil régulateur via FOXP3 [240]. Chez l'homme, deux études récentes se sont intéressées au rôle de HIF-1α dans le sepsis. Dans l'étude de Shalova *et al.*, HIF-1α était surexprimé au sein des monocytes de patients septiques entrainant un mécanisme immunosuppressif via l'inhibition de la voie des TLR par IRAKM [228]. Au contraire, dans l'étude de Schäfer *et al.,* les patients septiques présentaient une sous-expression de HIF-1α comparativement aux contrôles. De même, la stimulation *in vitro* de monocytes de patients septiques par du LPS induisait une sous expression de HIF-1α comparativement aux contrôles [241]. L'hypothèse des auteurs pour expliquer cette contradiction était que les prélèvements sanguins étaient

réalisés à un temps beaucoup plus précoce dans l'étude de Shalova *et al*. (2 heures vs 24 heures).

Le phénomène de reprogrammation monocytaire, à l'origine de la paralysie immunitaire engendre de profonds remaniements sur le plan métabolique. En effet, à la phase aiguë d'un sepsis, on observe une activation de la voie de la glycolyse au dépend de la phosphorylation oxydative médiée par la voie Akt-mTOR-HIF1 α [232]. Un modèle de monocytes immunotolérant a été réalisé *in vitro* en étant exposé à de fortes concentrations de LPS avant d'être restimulé 24h plus tard. Cette re-stimulation n'a entrainé aucune production de cytokines pro-inflammatoires et a montré une diminution de l'expression de gènes dans toutes les voies métaboliques principales (phosphorylation oxydative, glycolyse et béta-oxydation des acides gras) [232].

Ainsi, au cours du sepsis, les monocytes subissent une reprogrammation entrainant un profil immunosuppressif et hypométabolique à l'origine du phénomène d'immunotolérance. Ce phénomène est nécessaire au retour à l'état homéostatique mais peut être délétère s'il est prolongé. Le facteur de transcription HIF-1α joue un rôle important dans cette reprogrammation mais son rôle exact et ses voies de régulation sont imparfaitement comprises à ce jour.

ETUDE PRELIMINAIRE

En choisissant comme modèle de stress la fracture du col fémoral, notre équipe a conduit une première étude [194] en collaboration avec l'unité péri-opératoire gériatrique de l'hôpital Pitié Salpêtrière (Pr Boddaert) afin d'évaluer comment le stress induit par cet événement aigu affecte le système immunitaire des patients âgés atteints d'une FESF. Cette étude a montré que les patients atteints d'une FESF (n = 60) présentent des changements dans leur immunité innée (hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles) et adaptative (lymphopénie CD4+ et CD8+) dans les premiers jours suivant la fracture, comparativement aux sujets âgés en bonne santé (n = 45). Ces modifications sont transitoires, ce qui suggère une compartimentation des sous-ensembles cellulaires pour faire face à cet événement. Parallèlement, d'importants processus inflammatoires se produisent et révèlent que l'activation des monocytes/macrophages induite par l'IFN-γ constitue le meilleur prédicteur de mortalité dans la population âgée souffrant d'une FESF. En effet, la concentration plasmatique de néoptérine est significativement plus élevée chez les patients décédés que chez les survivants (p = 0,0004). Son taux mesuré à l'arrivée à l'hôpital est corrélé négativement avec la durée de survie (r = -0,67; p = 0,03). De plus nous avons établi que pour une valeur seuil, ce biomarqueur était prédictif de mortalité à 6 mois (AUC = 0,86, brevet Sauce *et al*. INSERM-TRANSFERT) [194].

HYPOTHESES DU PROJET et OBJECTIFS

Notre hypothèse est donc qu'il y a une activation précoce et nécessaire de l'immunité innée et adaptative qui permet une réactivité immunitaire immédiate. Au cours de l'hospitalisation, c'est à dire dans les jours suivants la chirurgie, cette hyper-activation est amortie (boucle de rétrocontrôle). En effet, si cette activation immunitaire persiste trop longtemps, elle peut être délétère pour l'organisme et entrainer des complications cliniques pouvant conduire au décès du patient. Ainsi, cette théorie du «non-retour à l'état homéostasique» suggère que les décès post fracture sont liés à l'activation persistante de l'immunité innée et que cet état pro-inflammatoire persistant pourrait entrainer des dommages collatéraux induits par le stress oxydatif et conduire ainsi à la mort (Figure 10).

Les objectifs de mon travail sont donc : 1. Décrire les modifications immunitaires induites par la FESF en réalisant une analyse longitudinale du phénotype inné et adaptatif des patients fracturés. 2. D'étudier les différences fonctionnelles potentielles au sein des monocytes permettant d'expliquer la différence d'évolution des patients (survivants ou décédés à 6 mois). 3. D'étudier la fonctionnalité de la néoptérine et son mécanisme d'action afin de définir son effet potentiellement délétère chez les patients.

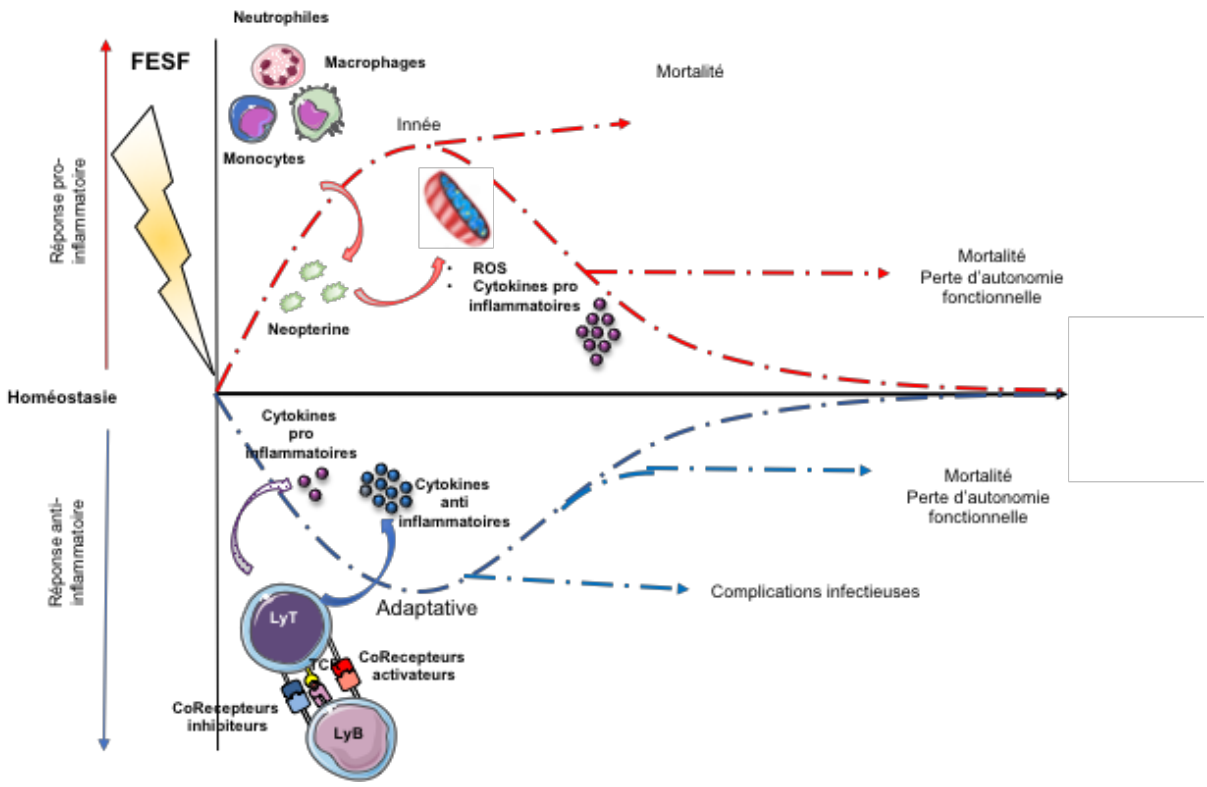


Figure 10 : Boucle de régulation des phénomènes inflammatoires associés à la fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF). La FESF entraine une hyper-activation du système immunitaire inné contrebalancé par un état suppressif sur le versant adaptatif permettant le retour à l'homéostasie. En cas de non-retour à l'homéostasie, le risque de mortalité et de perte d'autonomie fonctionnelle est augmenté.

MATERIEL ET METHODES

Constitution de la cohorte et prise en charge des échantillons

1. Cohorte de patients

La cohorte HIPAGE a été montée en collaboration avec l'unité péri-opératoire gériatrique de l'hôpital de la Pitié Salpêtrière (Pr Jacques Boddaert). Tous les patients âgés de plus de 75 ans, admis aux urgences pour une fracture du col fémoral et hospitalisés dans l'unité ont été inclus. Étaient exclus les fractures sur os pathologique, les patients atteints d'un cancer solide ou d'une hémopathie active, les patients sous traitement immunosuppresseurs/corticoïdes, les patients atteints d'une pathologie auto-immune. Chaque patient inclus dans l'étude était prélevé à 5 temps pré (J0) et post opératoire précoce (J1, J3, J6) ainsi qu'à un point de suivi plus tardif 6 à 12 mois après l'intervention chirurgicale).

En parallèle, des patients âgés de plus de 75 ans, servant de groupe contrôle ont été inclus et prélevés une fois, lors d'une consultation ou d'une évaluation gériatrique en hôpital de jour au sein du même service. Les critères d'exclusion étaient la présence d'un évènement médical aigu quel qu'il soit (infection, décompensation cardiaque ou pulmonaire), des troubles cognitifs sévères (MMS<20), un antécédent de cancer, pathologie auto-immune et traitement immunosuppresseur.

Un consentement éclairé a été signé par chaque patient. L'étude a reçu l'accord du comité éthique de l'hôpital de la Pitié Salpêtrière.

Chaque prélèvement consistait en une prise de sang de 40ml sur tubes héparinate de lithium qui était acheminé immédiatement au laboratoire.

Les données cliniques et biologiques (biologie de routine) étaient rentrées prospectivement dans une base de données au sein du service hospitalier. Cette base de données comprend de nombreuses informations telles que les comorbidités, le type

de fracture et de chirurgie, les complications post opératoires, le délai de reprise de la marche, la vitesse de marche, les scores d'autonomie fonctionnelle et de fragilité pré fracturaire et à distance de la fracture (6 et 12 mois).

2. Prise en charge des échantillons

Dès réception, les échantillons de sang étaient répartis comme suit :

- 700µL de sang pour réaliser le phénotypage T/B/NK en laboratoire de routine
- 1 aliquot de 1ml de sang total destiné au service de virologie pour tester les sérologies vis-à-vis de plusieurs infections virales (notamment herpes virus)
- 1 aliquot de 1ml de sang + 10% DMSO (cryobanque du laboratoire de recherche)
- 100µl de sang pour le marquage en sang frais
- Les 37ml de sang restant étaient déposés sur un gradient de Ficoll (Eurobio) à raison d'1/3 de ficoll pour 2/3 de sang, puis centrifugés 25 min à 2200rpm. Deux aliquots de plasma de 1,5ml étaient conservés à -80°C. L'anneau contenant les cellules mononuclées (PBMCs) était récupéré et lavé en RPMI. La numération cellulaire se faisait en lame Kova en présence de bleu de trypan (dilution au 10ème) (Gibco by Life Technologies). Les PBMCs étaient ensuite repris dans un milieu de congélation (RPMI, 20% SVF, 10% DMSO) à raison de 5millions de cellules par ml puis congelées à -150°C.

Phénotypage

1. Marquage des monocytes et neutrophiles en sang frais

Un marquage membranaire en sang frais est réalisé. Les anticorps sont déposés sur le sang dans un tube FACS (cf tableau 4). Après une incubation de 15min à température ambiante, la lyse est réalisée par adjonction de 2 ml de lysis buffer (BD FACS) dilué 10X dans de l'eau pendant 5min. Le tube est ensuite centrifugé et le surnageant retiré. Après adjonction de 200µl de PBS, l'analyse est réalisée par cytométrie en flux (BD LSR-Fortessa). La stratégie d'analyse par fenêtrage est expliquée dans la figure 11

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage en sang frais des monocytes et neutrophiles

Anticorps	Hôte	Conjugué	Clone	Fournisseur	Quantité (µl)
CD3	Souris	FITC	UCHT1	BD Biosciences	3µl
CD14	Souris	BV605	M5E2	BD Biosciences	5µl
HLA-DR	Souris	PE-CF594	G46-6	BD Biosciences	5µl
CX3CR1	Rat	PE	2A9-1	eBioscience	5µl
CCR2	Souris	APC	48607	R&D systems	5µl
CD62L	Souris	PerCP-eF710	DREG-56	eBioscience	3µl
CD16	Souris	APC-H7	3G8	BD Biosciences	1,5µl

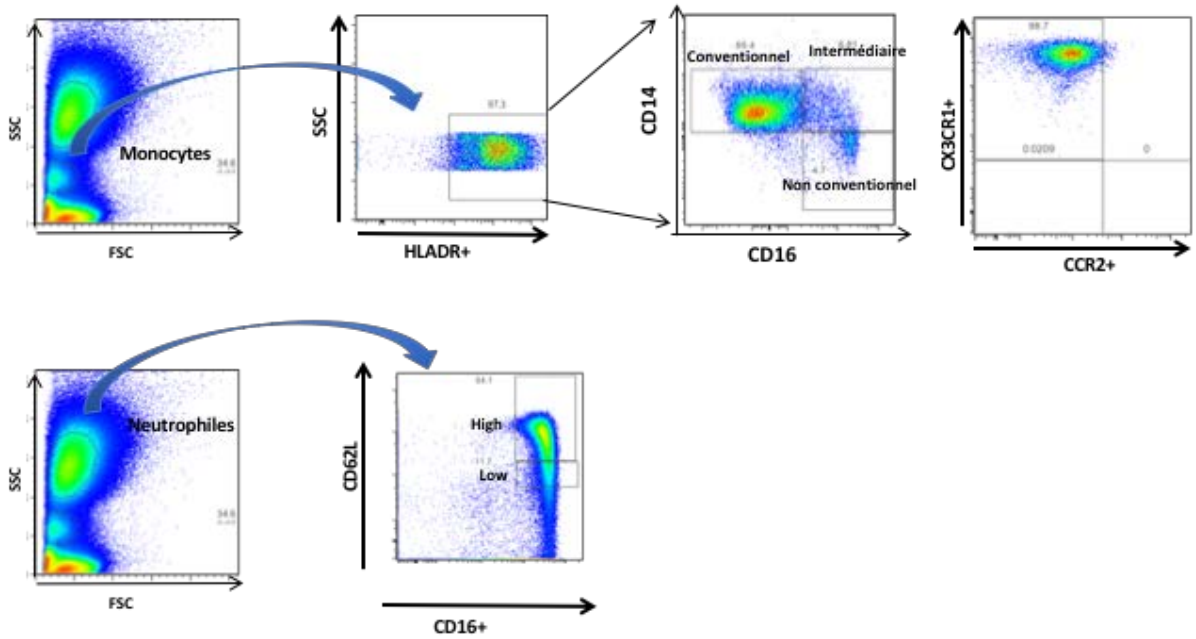


Figure 11: Phénotypage en sang frais des monocytes et des polynucléaires neutrophiles. Après avoir délimité en taille structure les monocytes, une sélection est faite sur le CD14+ et le CD16+ au sein des cellules HLA-DR+, déterminant ainsi les 3 sous-catégories de monocytes : CD14+ CD16- (conventionnels), CD14+ CD16+ (intermédiaires) et CD14- CD16+ (non conventionnels). La selection se fait ensuite par le CX3CR1 et le CCR2 au sein de chaque sous-population. Après avoir délimité en taille structure les polynucléaires neutrophiles, ils sont selectionnés sur de CD16+ et le CD62L.

2. Phénotypage de l'immunité cellulaire

2.1 Phénotypage des lymphocytes T CD4+ et T régulateurs

Après décongélation d'1 million de cellules par prélèvement, celles-ci étaient placées dans un tube FACS et lavées en PBS-2%SVF. Les anticorps étaient déposés pour le marquage membranaire (tableau 5), incubés 15mn à température ambiante puis lavées en PBS-2%SVF. Pour permettre le marquage intracellulaire (FOXP3), une perméabilisation était réalisée avec 1ml de tampon de perméabilisation nucléaire spécifique de l'anticorps Foxp3 (eBiosciences) dilué au ¼ pendant 30min à 4°C. Après lavage, l'anticorps FOXP3 était déposé et incubait 30min à 4°C (sur glace). Un dernier

lavage était réalisé puis, après adjonction de 200µl de PBS, l'analyse était réalisée par cytométrie en flux (BD LSR-Fortessa). La stratégie d'analyse est expliquée dans la figure 12

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour le phénotypage des LT régulateurs

	Anticorps	Hôte	Conjugué	Clone	Fournisseur	Quantité (µl)
Mb	CD127	Souris	eF450	eBioRDR5	eBioscience	5µl
Mb	CD15s	Souris	BV510	CSLEX1	BD Biosciences	5µl
Mb	CD3	Souris	BV650	OKT3	Biolegend	3µl
Mb	CD25	Souris	BV785	BC96	Biolegend	3µl
Mb	CD4	Souris	APC-CY7	RP4-T4	BD Biosciences	1µl
IC	FOXP3	Souris	AF647	259D	Biolegend	10µl

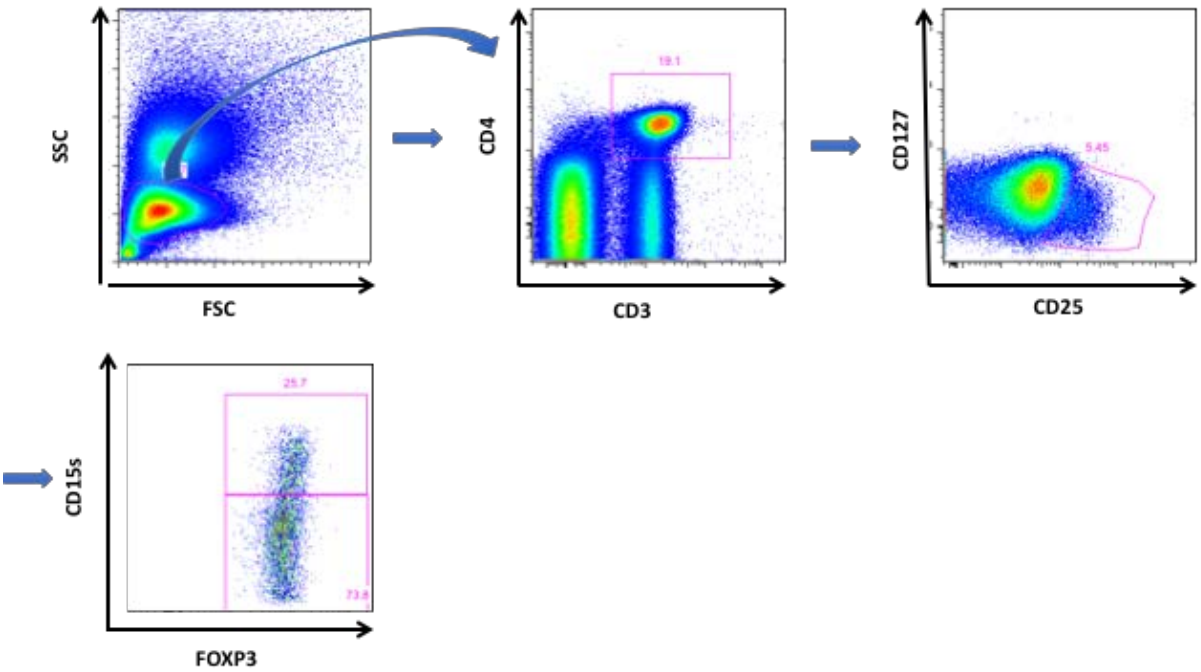


Figure 12: Phénotypage des lymphocytes T régulateurs. Après avoir délimité en taille structure les lymphocytes, une sélection est faite sur le CD3+ et le CD4+. Au sein de cette population de LTCD4+, seuls les CD127low CD25high sont sélectionnés. Au sein de cette population les cellules sont sélectionnées sur l'expression de FOXP3+ et une sous sélection supplémentaire est faire sur le CD15s+.

2.2 Phénotypage des corécepteurs inhibiteurs et activateurs

Après décongélation, 1 million de cellules était placé dans un tube FACS et lavé en PBS-2%SVF. Les anticorps étaient déposés pour le marquage membranaire (tableau 6), incubés 15mn à température ambiante puis lavées en PBS-2%SVF. Après adjonction de 200µl de PBS, l'analyse était réalisée par cytométrie en flux (BD LSR-Fortessa). L'analyse de l'expression des corecepteurs a été faite par la mesure de la moyenne d'intentité de fluorescence au sein des LT CD4+ et CD8+ et des monocytes (HLA-DR+)

Tableau 6 : liste des anticorps utilisés pour le phénotypage des check-point au sein des LT

Anticorps	Hôte	Conjugué	Clone	Fournisseur	Quantité (µl)
CCR7	Rat	PC7	3D12	BD Biosciences	3µl
CD45RA	Souris	V450	HI100	BD Biosciences	2µl
CD4	Souris	HV500	L200	BD Biosciences	5µl
HLA-DR	Souris	BV650	G46-6	BD Biosciences	5µl
PD1	Souris	BV711	EH12.2H7	Biolegend	5µl
LAG3	Souris	FITC	11C3C65	Biolegend	5µl
2B4 (CD244)	Souris	PE	C1.7	Biolegend	2µl

4-1BB (CD137)	Souris	PECy5.5	4B4-1	BD Biosciences	2µl
CTLA4	Souris	APC	BNI3	BD Biosciences	5µl
TIM3	Rat	AF700	# 344823	R&D systems	10µl
CD8	Souris	APCCy7	SK1	BD Biosciences	3µl

Fonctionnalité monocytaire et reprogrammation

1. Stimulation *in vitro* des monocytes

Après décongélation des PBMCs, les cellules étaient déposées en plaque de culture 48 puits à raison de 1 million de PBMCs pour 500µl de R10 (RPMI-SVF 10%). La stimulation s'effectuait en LPS (lipopolysaccharide) à une concentration finale de 1µg/ml. Une heure après la stimulation, 5µl de Brefeldine (Sigma-Aldrich) était ajouté dans chaque puit (concentration finale : 1µg/ml). Les PBMCs étaient ensuite maintenus toute une nuit dans un incubateur à 37°C. Le lendemain matin, le surnageant de culture était récupéré et conservé à -20°C. Les cellules étaient également récupérées, lavées en PBS 2%SVF puis le marquage membranaire était réalisé. Une fois les anticorps déposés (tableau 7), et après une incubation de 15min à température ambiante, un lavage était réalisé. Les cellules étaient ensuite perméabilisées avec 200µl de Cytofix/cytoperm (eBiosciences) pendant 30min à 4°C. Elles étaient ensuite lavées afin d'effectuer le marquage intracellulaire. Une fois les

anticorps déposés (tableau 8), et après une incubation de 30min à 4°C, un dernier lavage était réalisé. Après adjonction de 200µl de PBS, l'analyse était réalisée par cytométrie en flux (BD LSR-Fortessa). La stratégie d'analyse est expliquée dans la figure 13

Tableau 7 : Stimulation des monocytes : liste des anticorps utilisés pour le marquage membranaire

Anticorps	Hôte	Conjugué	Clone	Fournisseur	Quantité (µl)
CD163	Souris	BV421	GHI/61	Biolegend	3µl
CD14	Souris	BV605	M5E2	BD Biosciences	5µl
HLA-DR	Souris	BV650	G46-6	BD Biosciences	5µl
CD16	Souris	APC-H7	3G8	BD Biosciences	1,5µl
CD3	Souris	AF700	UCHT1	BD Biosciences	3µl

Tableau 8 : Stimulation des monocytes : liste des anticorps utilisés pour le marquage intracellulaire

Anticorps	Hôte	Conjugué	Clone	Fournisseur	Quantité (µl)
IL-8	Souris	BV510	G265-8	BD Biosciences	3µl
IL-10	Rat	AF488	# 2050B	R&D systems	3µl
IL-1β	Souris	PE	CRM56	eBioscience	3µl
TGF-β	Souris	PE-CF594	TW4-2F8	BD Biosciences	3µl
IL-6	Souris	PECy7	MQ2-13A5	Biolegend	3µl
TNF- α	Souris	APC	Mab11	BD Biosciences	3µl

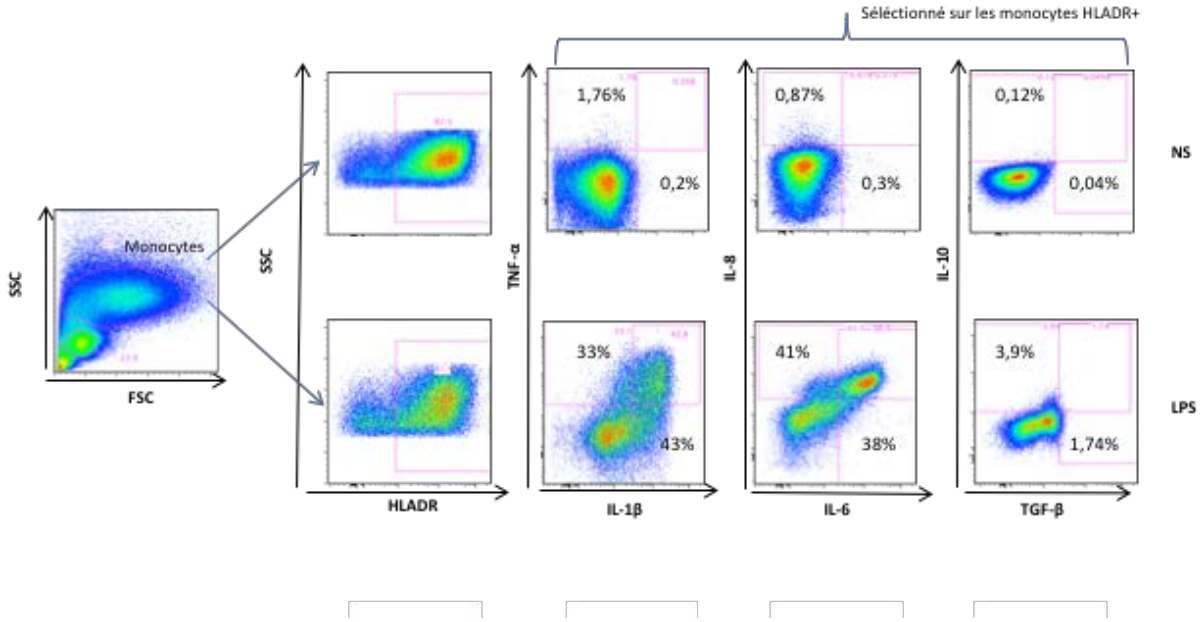


Figure 13: Stratégie d'analyse pour déterminer l'induction de cytokines par les monocytes. Après avoir délimité en taille structure les monocytes, les cellules HLA-DR+ sont sélectionnées. Les 3 sous population CD14+CD16- CD14+CD16+ et CD14-CD16+ sont identifiées. Au sein de chacune de ces sous populations, les cellules TNF-α+, IL-1β+, IL-8+, IL-6+, IL-10+ et/ou TGF-β+ sont sélectionnées pour analyse en condition non stimulé (NS) et stimulé par le lipopolysaccharide (LPS)

2. Etude de la reprogrammation monocytaire et inflammasome

   a. Mise en culture des PBMCs

Après décongélation des PBMCs, ces derniers étaient repris dans du RPMI-10%SVF à la concentration de 4 millions par ml et déposés en plaque 96 puits à raison de 250µl par puits. Les PBMCs étaient ensuite stimulés avec différents inducteurs :

- LPS *E. coli* serotype O55 :B5 (Alexis Biochemicals Lot L25660) à la concentration finale de 10µg/ml
- Néoptérine (Cayman Chemical Company) à la concentration finale de 100µg/ml

Les PBMCs étaient ensuite placés en culture à 37°C pendant 6 heures puis centrifugés pour réaliser des culots cellulaires.

b. Extraction d'ARN

L'extraction a été réalisée avec le Kit NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel). Le culot cellulaire a été lysé et homogénéisé avec 100µl d'une solution comprenant 2µl de TCEP et 98µl de Buffer RA1. Après avoir vortexé les échantillons, 5µl de carrier RNA ont été ajoutés puis 100µl d'éthanol à 70%. Le tout a été transféré sur une colonne et centrifugé 30sec à 11,000g. Après avoir passé la colonne sur un nouveau tube de recueil, 100µl de MDB a été rajouté puis les échantillons centrifugés 30sec à 11,000g. 25µl d'un mix comportant de la rDNAse a été déposé sur le filtre et incubé 15min à température ambiante. Trois étapes de lavages ont ensuite été réalisées avec les buffers RA2 et RA3 puis l'ARN a été éluée dans 10µl d'H20 « RNA free ». La concentration des ARN a été vérifiée par mesure de l'absorbance à 260nm au Nanodrop 2000c® puis tous les échantillons ont été remis à la même concentration.

c. Reverse transcription

Cette étape a été réalisée sur glace grâce au « cDNA Synthesis Kit SuperScript VILO kit» (Invitrogen). Dix microlitres d'ARN par échantillon ont été déposés sur des barrettes de PCR. Pour chaque échantillon était rajouté 2µl de « SuperScript Enzyme 10X » et 4µl de VILO 5X. De l'eau a été rajouté pour compléter à 20µl par échantillons. Les échantillons ont ensuite été placés dans le thermocycleur (Applied Biosystems 7300) pour la synthèse d'ADN complémentaire. Le programme comprenait 3 phases : une première de 10min à 25°C, une deuxième de 60min à 42°C et enfin une dernière étape de 5min à 85°C. Les ADN complémentaires étaient ensuite stockés à -20°C dans l'attente de la qPCR.

d. Réalisation de la q-PCR

La q-PCR a été réalisée avec le « Power SYBR Green PCR Master Mix » (Appliedbiosystem, Thermofisher). Les ADN complémentaires ont été préalablement dilués au 100ème dans de l'H20 RNAse free puis l'ADN a été déposé au minimum en duplica sur plaque 96 puits (« MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate », Appliedbiosystems, Thermofisher) à raison de 5µl par puit. Dans chaque puits ont été rajouté 12,5µl de SYBER Green 2X, et les amorces d'intérêts (1µl d'amorce sens et 1µl d'amorce anti-sens). Le volume est ensuite complété par de l'eau pour un volume final de 25µl. La liste des amorces spécifiques et leurs séquences sont rapportées dans le tableau 9. La qPCR est réalisée sur thermocycleur (Applied Biosystems 7300) selon le cycle suivant :

- 1ère phase de 5min à 95°C répétée 1 fois
- 2ème phase décomposée en 3 sous-parties : 15sec à 95°C, 1min à 60°C, 10sec à 72°C. Cette deuxième phase est répétée 40 fois.

Tableau 9 : Séquences des amorces spécifiques utilisées en qPCR

Amorce	Séquence (5' ➔ 3')
B-ACTINE sens	GCTACGAGCTGCCTGACG
B-ACTINE anti-sens	GGCTGGAAGAGTGCCTCA
HIF1A sens	CAGTCGACACAGCCTGGATA
HIF1A anti-sens	TTCTTCTGGCTCATATCCCATCAA
IRAKM sens	ATTTCCGCGGTTGTGTAACG
IRAKM anti-sens	CCACAACAGACGGGACAACT
HAMP sens	CCACAACAGACGGGACAACT
HAMP anti-sens	GGGCAGGTAGGTTCTACGTC
MMP19 sens	GAGGCTCTGAGGGAGAGTCC
MMP19 anti-sens	CTGGGAATATCGGGAGTGCC
IL18 sens	AACACCTGCTTCAGGGGAAC
IL18 anti-sens	GCCTTGGCAGGTGAGTAAGA
BACH1 sens	TGCGATGTCACCATCTTTGT
BACH1 anti-sens	CCTGGCCTACGATTCTTGAG
KLF9 sens	GCCCAGTGTCTGGTTTCCAT
KLF9 anti-sens	TGGACTTTCCAGACTGTCGC
TXNRD1 sens	CTTTTTCATTCCTGCTACTCTACC
TXNRD1 anti-sens	CTCTCTCCTTTTCCCTTTTCC
TXNRD2 sens	CTCAGGCCCAGTTCAGTGTA
TXNRD2 anti-sens	TACTCTGCAAGCTACTGGCG
NLRP3 sens	GATCTTCGCTGCGATCAACAG
NLRP3 anti-sens	CGTGCATTATCTGAACCCCAC
ASC sens	TGGATGCTCTGTACGGGAAG
ASC anti-sens	CCAGGCTGGTGTGAAACTGAA
CASP1 sens	CACATCACAGGAACAGGCAT
CASP1 anti-sens	GCTTTCTGCTCTTCCACACC
IL1B sens	CCTGAAGCCCTTGCTGTAGT
IL1B anti-sens	AGCTGATGGCCCTAAACAGA

3. Tri cellulaire, extraction et analyse transcriptomique

Après décongélation, les PBMCs de patients fracturés (8 décédés et 5 survivants) et contrôle (n=6) ont été marqué par un anticorps membranaire antiCD14+-FITC (BD Pharmingen, souris anti-humain, clone M5E2) suivant le même protocole que décrit ci-dessus. Les PBMCs étaient immédiatement triés en cytométrie afin d'isoler les monocytes CD14+ (Biorad S3e cell sorter). Ces monocytes étaient remis en culture en R10 et la moitié d'entre eux étaient stimulées en LPS à une concentration finale de 1µg/ml pendant 6h. L'étude de la dose réponse et de la durée de la stimulation avait été préalablement évaluée sur CD14+ triés par l'analyse de l'expression différentielle des gènes ci-dessus en qPCR. Après stimulation les cellules étaient centrifugées pour être conditionnées en culot sec, conservé à -80°C dans l'attente de l'extraction d'ARN. L'extraction a été réalisée en Trizol (Invitrogen) afin d'obtenir la meilleure qualité possible d'ARN. Le culot cellulaire était repris dans 500µl de Trizol. Après une incubation de 5min sur glace, 100µl de chloroforme (Sigma-Aldrich) était ajouté. La suspension était alors vortexée 15sec, incubée 5min sur glace puis centrifugée 15min à 4°C (12000tr/min). La phase aqueuse supérieure était récupérée et déposée dans un nouvel eppendorf et 500µl d'Isopropanol (Sigma-Aldrich) était ajouté. Après une incubation de 10min sur glace, la suspension était centrifugée 15min à 4°C (12000tr/min). Le surnageant était enlevé afin de ne garder que le culot d'ARN et celui-ci était lavé avec 500µl d'éthanol 70%. Après une nouvelle étape de centrifugation, l'ARN était repris dans 20µl d'eau « RNAse free ». La qualité de l'ARN des échantillons était évaluée par la mesure des RIN (RNA Integrity Number). Les échantillons étaient déposés sur puces « Agilent RNA 6000 Pico® » (France) et analysés au Bioanalyseur 2100 Agilent. Seuls les échantillons de bonne qualité (RIN≥6) ont été retenu pour l'analyse transcriptomique qui est en cours de réalisation à la plateforme. Nous avons

finalement retenu 74 échantillons : 6 décédés et 5 vivants (à J0, J1, J3, J6 et M>6) ainsi que 4 contrôles en condition stimulé (LPS) et non stimulé.

Etude de la fonctionnalité de la néoptérine

1. Stimulation *in vitro* des PBMCs pour induction de néoptérine

Après décongélation des PBMCs, ils étaient déposés en plaque de culture 96 puits à raison de 3 millions de PBMCs par ml, 250µl de R10 (RPMI, SVF 10%) par puits. La stimulation s'effectuait avec 7 inducteurs : LPS (lipopolysaccharide) à une concentration finale de 1µg/ml, IFNγ à une concentration finale de 0,05µg/ml, PHA à une concentration finale de 10µg/ml, Concavaline A (ConA) à une concentration finale de 10µg/ml, TNF-α à une concentration finale de 1000UI/ml, IFNγ+TNF-α (aux même concentrations) et IL-6 à une concentration finale de 500UI/ml. Les PBMCs étaient ensuite maintenus en culture 24h dans un incubateur à 37°C. Les surnageants étaient ensuite récupérés à raison de 40µl pour le dosage de la néoptérine en ELISA. Le reste du surnageant était conservé à -20°C.

Dosage de la néoptérine par technique ELISA :

Le dosage a été réalisé grâce à un kit de détection de type ELISA compétitif (Neopterin ELISA Kit Cat. No. 3610, Alpha Diagnosis International, Texas, USA). Après centrifugation, 20µl de standard, contrôle et serum étaient déposés en duplica dans chaque puits d'une plaque 96 puits pré-coatée avec un IgG anti-lapin. 100µl de néoptérine conjuguée à de la HRP et 50µl d'anticorps anti-néoptérine étaient déposés par puit. Après une incubation de 90min sur agitateur à l'abri de la lumière, 4 lavages étaient réalisés. 150µl de TMB étaient ajouté dans chaque puit et après 10min

d'incubation, la réaction était arrêtée par 150µl de solution stop. Le dosage était alors réalisé par double mesure de l'absorbance à 450nm (et 600nm en contrôle). Afin d'obtenir le pourcentage de néoptérine de l'échantillon fixé, une formule était appliquée à l'absorbance obtenue : %B/B0= Absorbance échantillon/absorbance à une concentration nulle de néoptérine (Standard A dans le kit).

Une courbe standard logarithmique était réalisée comprenant la concentration de néoptérine (nmol/l) en abscisse et le %B/B0 correspondant en ordonnée. L'équation de la droite obtenue était ensuite appliquée aux échantillons afin de déduire la concentration en nmol/l.

2. Rôle de la néoptérine dans la mort cellulaire et l'induction de cytokines

2.1 Mise en culture et stimulation

Après décongélation des PBMCs, ces derniers était repris dans du R10 à la concentration de 2millions par ml et déposés en plaque 48puits à raison de 500ml par puit. Ils étaient ensuite stimulés par 3 concentrations différentes de néoptérine (Cayman Chemical Company) : 100µg/ml, 50µg/ml et 10µg/ml. Une heure après la stimulation, 5µl de Brefeldine (Sigma-Aldrich) était ajouté dans les puits dédiés à l'évaluation de la production de cytokines (concentration finale : 1µg/ml) Ils étaient ensuite mis en culture à 37°C pendant 24h. Les cellules étaient ensuite récupérées et lavées en PBS avant de procéder au marquage.

2.2 Marquage Annexin V

Un marquage membranaire était d'abord réalisé (liste des anticorps tableau 10). Une fois les anticorps déposés et incubés 15min à température ambiante, les cellules étaient lavées, reprisent dans 100µl d'Annexin Binding Buffer 1X (BD Pharmingen™)

et marquées à l'Annexin V. Après une incubation de 15min à 4°C les cellules étaient passées au FACS pour analyse. La stratégie de sélection des cellules est présentée sur la figure 14.

Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage de mort cellulaire					
Anticorps	Hôte	Conjugué	Clone	Fournisseur	Quantité (µl)
CD14	Souris	BV605	M5E2	BD Horizon™	5µl
CD19	Souris	FITC	HIB19	BD Pharmingen™	10µl
CD3	Souris	ECD	UCHT1	Beckman Coulter	5µl
CD56	Souris	PC7	N901NKH-1	Beckman Coulter	3µl
Annexin V		Pacific Blue	MQ2-13A5	Invitrogen	5µl

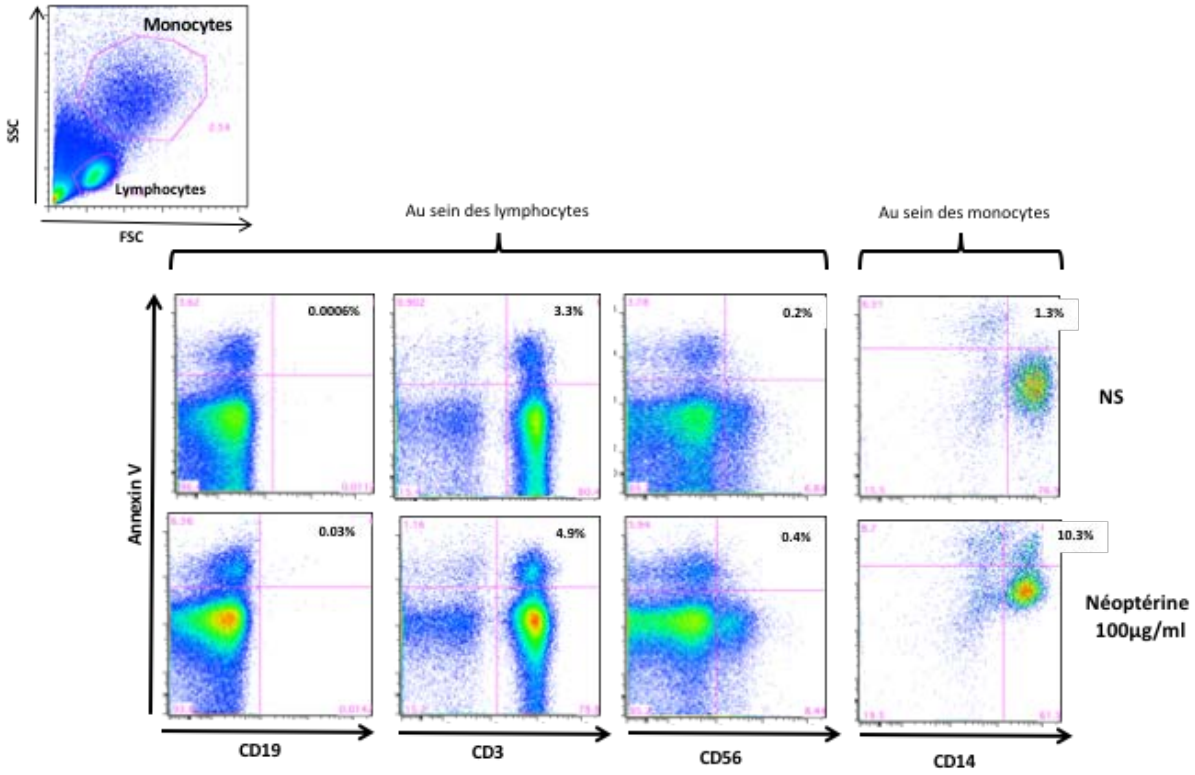


Figure 14: Stratégie d'analyse pour déterminer l'induction de la mort cellulaire des différentes populations par la néoptérine (100µg/ml). Après avoir délimité en taille structure les monocytes et les lymphocytes, les cellules Annexin V positives étaient identifiées au sein des population CD14+, CD19+, CD3+ et CD56+.

2.3 Evaluation de la production de cytokines

Dans les mêmes conditions de stimulations, un marquage membranaire et intra-cellulaire ont été combinés afin de déterminer la fréquence de cellule sécrétant de l'IL-8, de l'IFNγ, de l'IL-1β et du TNFα (liste des anticorps tableau 11). Une fois les anticorps déposés et incubés 15min à température ambiante, les cellules étaient lavées en PBS puis reprise avec 200µL de Cytofix/cytoperm et incubée à 4°C pendant 30min. Après un lavage avec le tampon TP Wash ebio dilué au 10ème, les anticorps du marquage intracellulaire (liste des anticorps tableau 12) étaient déposés sur les cellules. Après une nouvelle incubation à 4°C pendant 30min et un dernier lavage, les cellules étaient passées au FACS pour analyse. La stratégie de sélection des cellules

était la même que celle présentée figure 13: les cellules productrices de cytokines (IL-8, IFNγ, IL-1β et TNFα) étaient identifiées au sein des CD3+, CD19+, CD56+ et CD14+.

Tableau 11 : Induction de cytokines après stimulation par la néopterine : liste des anticorps utilisés pour le marquage membranaire.

Anticorps	Hôte	Conjugué	Clone	Fournisseur	Quantité (µl)
CD14	Souris	BV605	M5E2	BD Horizon™	5µl
CD19	Souris	V450	HIB19	BD Horizon™	3µl
CD3	Souris	ECD	UCHT1	Beckman Coulter	5µl
CD56	Souris	PC7	N901NKH-1	Beckman Coulter	3µl
HLA-DR	Souris	AF700	G46-6	BD Pharmingen™	5µl
CD16	Souris	APC-H7	3G8	BD Pharmingen™	1.5µL

Tableau 12: Induction de cytokines après stimulation par la néopterine : liste des anticorps utilisés pour le marquage intracellulaire					
Anticorps	Hôte	Conjugué	Clone	Fournisseur	Quantité (µl)
IL-8	Souris	BV510	G265-8	BD Biosciences	3µl
IFNγ	Souris	FITC	25723.11	BD Fastimmune™	10µl
IL-1β	Souris	PE	CRM56	eBioscience	3µl
TNFα	Souris	APC	MAb11	BD Biosciences	3µl

3. Induction de ROS

Après isolation de PMBCs à partir de sang frais de donneurs contrôle issus de l'Etablissement Français du Sang par la technique du Ficoll (cf supra), ces derniers étaient repris dans du Hank's Balanced Solution (HBSS) enrichi en calcium et magnésium (Sigma-Aldrich) à raison de 10 millions de PBMCs par ml de HBSS. Ils étaient ensuite mis en culture en plaque 96 puits à raison de 250ml par puit. Le Luminol (Sigma-Aldrich) et la peroxydase (Sigma-Aldrich) étaient ajoutés à chaque puit aux concentrations finales respectives de 20µM et de 10U/ml. Le tout restait à incubé à 37°C pendant 30min. Les inhibiteurs de ROS étaient éventuellement rajoutés (SOD-PEG, Catalase-PEG tous à la concentration finale de 10UI/ml (Sigman-Aldrich)) et l'incubation poursuivie 5min à 37°C. A noter que seule les formes pégilées des inhibiteurs étaient utilisées afin d'inhiber la production intracellulaire de ROS. La stimulation des PBMCs étaient ensuite effectuée grâce à différents inducteurs :

- PMA (Sigma-Aldrich) à la concentration finale de 0,1µg/ml

- LPS *E. coli* serotype O55 :B5 (Alexis Biochemicals Lot L25660) à la concentration finale de 10µg/ml
- Néoptérine (Cayman Chemical Company) à la concentration finale de 100µg/ml.

Immédiatement après la stimulation, la mesure des ROS s'effectuait sur le lecteur Flexstation3, à 37°C, en luminescence et suivant une cinétique permettant une mesure toute les 45 secondes pendant 45min.

4. Mesure de la peroxydation des lipides dans le plasma des patients

La mesure de la peroxydation des lipides a été faite par le dosage du malondialdéhyde (MDA) en utilisant le « Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit » de Sigma-Aldrich.
Dans un premier temps, les standards (MDA) étaient dilués suivant une gamme de concentration allant de 0 à 10µM pour un volume final de 200µL. Parallèlement, 20µl de plasma était mixé avec 500µl d'acide sulfurique à 42mM et 125µl de phosphotungstic acid solution. Après 5min d'incubation, les échantillons étaient centrifugés à 13,000g pendant 3min afin de former un « culot ». Le surnageant était enlevé et le « culot » repris sur glace avec 200µL BHT dilué dans de l'eau au 100ème.
Six cent microlitres de TBA solution étaient ajoutés aux échantillons et aux standards puis incubé 1h à 90°C. Les standards étaient ensuite transférés sur plaque 96 puits. 300µl de 1-Butanol et 100µl de NaCL 5M étaient ajoutés à chaque échantillon puis l'ensemble était centrifugé à 16,000g pendant 3min. La couche supérieure (20µL) était alors récupérée et mélangée à 180µl d'H2O avant d'être retransférée sur plaque 96 puits. La plaque était alors lue sur le lecteur Flexstation 3, en fluorescence, après réglage de l'onde d'excitation et d'émission respectivement à 532 et 553mm.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel Prism 5 (GraphPad Software) et SPSS (v20). Les variables continues ont été exprimées en médiane [Interquartile 25 ;75]. Les variables catégorielles ont été exprimées en nombres et pourcentages. La comparaison entre les groupes a été réalisée avec le test de Mann Whitney ou de Wilcoxon lorsque les variables étaient appariables. Le seuil de significativité a été fixé avec un p inférieur à 0,05.

RESULTATS

Préambule : analyse de la cohorte

1. Description clinique

Cinquante patients présentant une FESF (dont 9 sont décédés à 1 an) et 10 contrôles ont été inclus dans l'étude. Les principales caractéristiques cliniques sont présentées dans le tableau… L'âge médian de la cohorte était de 87 [83-92] ans et 28% d'entre eux étaient des hommes. La plupart (62%) présentaient une fracture per-trochantérienne. Les patients décédés à 1 an étaient significativement plus comorbides (CIRS 14 [11-16] vs 9 [7-12] ; p=0,0003) notamment en raison d'une fréquence plus importante de troubles cognitifs et d'insuffisance rénale chronique (tableau 13). Les patients décédés à 1 an prenaient également significativement plus de médicaments que les survivants (8 [7-9] vs 5 [3-7] ; p=0,03) et présentaient plus de complications post-opératoires (8 [5-9] vs 4 [3-6] ; p=0,01). En revanche l'autonomie fonctionnelle pré-fracturaire des patients était comparable.

Tableau 13 : Caractéristiques cliniques de la cohorte de patients

Variable Médiane [IQR] n(%)	**Total** **(n=50)**	**Survivants** **(n=41)**	**Décédés** **(n=9)**	**P value**
Age (années)	87 [83-92]	86 [81-91]	91 [87-92]	0,14
Sexe (Homme)	14 (28%)	4 (10%)	5 (56%)	0,04
Type de fracture				0,07
Per trochantérienne	31 (62%)	23 (56%)	8 (89%)	
Cervicale	19 (38%)	18 (44%)	1 (11%)	
Comorbidités				
CIRS	10 [8-13]	9 [7-12]	14 [11-16]	0,003
Troubles cognitifs	20 (40%)	13 (32%)	7 (78%)	0,01
HTA	36 (72%)	29 (71%)	7 (78%)	0,7
Diabète	9 (18%)	8 (19,5%)	1 (11%)	0,6
ICC	5 (10%)	3 (7%)	2 (22%)	0,2
IRC	26 (52%)	18 (44%)	8 (89%)	0,01
Nb de traitement	5 [3-9]	5 [3-7]	8 [7-9]	0,03
Autonomie				
Vit en institution	6 (12%)	4 (10%)	2 (22%)	0,3
Marche	47 (94%)	39 (95%)	8 (89%)	0,7
ADL	5,5 [3,5-6]	6 [4-6]	4 [2,5-5,5]	0,3
IADL	2 [0,4-4]	3 [0,9-4]	1,5 [0-2]	0,2
CFS	4,5 [4-6]	4,5 [4-6]	4 [3-5]	0,1
Nombre de complications post-opératoire	5 [3-7]	4 [3-6]	8 [5-9]	0,01
Réadmission J30	5 (10%)	4 (10%)	1 (11%)	0,9

Les variables sont exprimées en médiane [IQR 25-75] ou en nombre et pourcentage. La valeur de p est significative si elle est inférieure à 0,005. CIRS : Cumulative Illness Rating Scale ; HTA : hypertension artérielle ; ICC : Insuffisance cardiaque chronique ; IRC : insuffisance rénale chronique ; ADL : Activity of daily living ; IADL : Instrumental activity of daily living ; CFS : clinical frailty scale ; RAD : retour à domicile

2. Description biologique

L'analyse de la numération formule sanguine (NFS) des patients montre une augmentation significative du nombre de monocytes chez les patients fracturés comparativement aux contrôles (870/mm^3 [610-990] vs 330/mm^3 [268-615] ; p=0,0004) ainsi qu'une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles (9570/mm^3 [7180-11470] vs 3135/mm^3 [1760-4465] ; p<0,0001). En revanche on note une lymphopénie significative chez les patients survivants comparativement aux contrôles (1755/mm^3 [1540-2288] vs 1140/mm^3 [785-1665] ; p=0,008) (Figure 15).

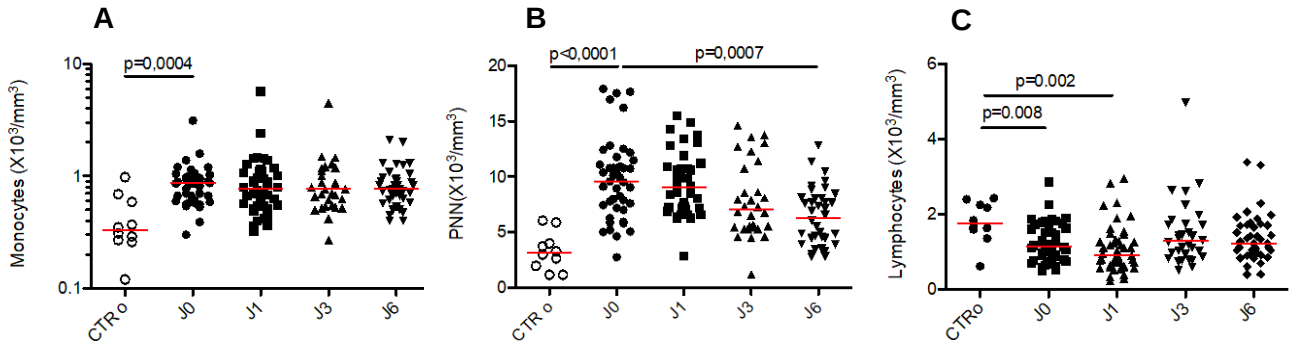


Figure 15 : Analyse longitudinale et comparaison de la numération formule sanguine des patients fracturés et contrôles. Taux de monocytes (**A**), PNN (**B**) et lymphocytes (**C**) exprimés en nombre de cellules X10^3/mm^3. Comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo, contrôle, PNN : polynucléaires neutrophiles.*

3. Résultats des dosages de néoptérine au sein de la cohorte

Le dosage plasmatique du taux de néoptérine a été effectué chez tous les patients de la cohorte afin de valider les résultats obtenus au cours de la première étude [194]. On retrouvait une augmentation significative des concentrations de néoptérine chez les patients décédés comparativement aux survivants, dès J0 (28,8nmol/l [18-73] vs 3,7nmol/l [8,1-9,2] ; p=0,0002) mais également à J1 (59,9nmol/l [12 ,5-61] vs 7,8nmol/l [4-11,6] ; p=0,004), J3 (43,5nmol/l [12,2-67,4] vs 8,9nmol/l [5,5-17] ; p=0,02) et J6 (42,7nmol/l [23-118] vs 12,6nmol/l [4,3-16,9] ; p=0,03) (figure 15). De plus, les taux de néoptérine étaient significativement plus élevés chez les patients décédés comparativement aux contrôles (28,8nmol/l [18-73] vs 10,9nmol/l [6,7-18,1] ; p=0,01) (Figure 16)

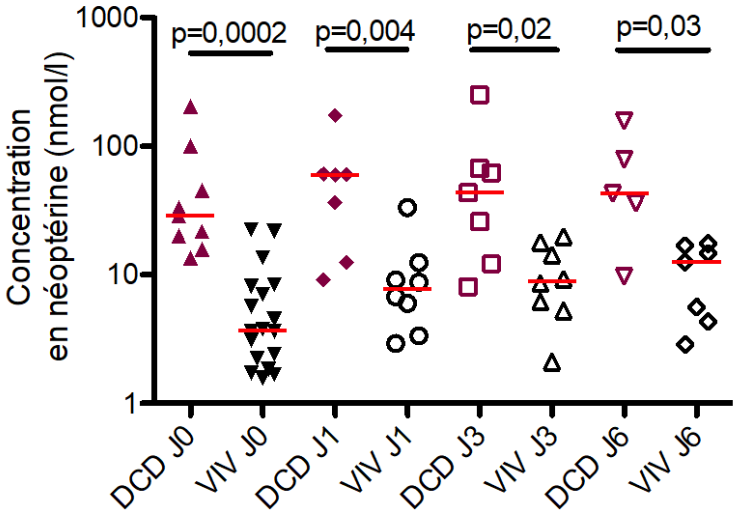


Figure 16 : Comparaison des concentrations plasmatiques de néoptérine entre les patients décédés et survivants à 1 an. Comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *VIV : survivant à 1 an ; DCD : décédé à 1 an.*

Partie 1 : Étude des modifications phénotypiques induites par la FESF au sein du compartiment inné et adaptatif

La FESF est un modèle de stress aigu chez le patient âgé et les données de la littérature indiquent qu'elle entraine des modifications au sein de l'immunité innée et adaptative. Ainsi, Baëhl *et al.* ont montré une altération de fonctionnalité des monocytes conventionnels et non conventionnels vers un phénotype pro-inflammatoire au décours de la fracture [242]. Ils ont également montré que la fracture entrainait des modifications fonctionnelles des PNN avec une baisse transitoire de leurs capacités de phagocytose et de chimiotactisme [189]. Ces deux travaux ne se sont intéressés qu'aux temps pré-opératoires et tardifs de sorte qu'il est impossible de savoir si ces éléments entrent dans une boucle de régulation. Dans d'autres études, le score NLR (ratio neutrophile/lymphocytes) semble prédictif de mortalité chez le patient après une FESF [243] et des altérations fonctionnelles (capacité de secrétion d'IL-10) sont observées au sein de LTreg et LBreg chez les patients développant un syndrome dépressif post-fracture [244].

Nous avons donc souhaité décrire de manière plus détaillée les modifications phénotypiques induites par la FESF à plusieurs temps pré (J0) et post opératoire (J1, J3, J6 et M>6) afin de comprendre si ces modifications pouvaient corroborer notre hypothèse initiale de boucle de régulation. Nous avons également souhaité étudier les différences phénotypiques potentielles entre les patients ayant survécus ou étant décédés à distance de la FESF.

1. Immunité innée

1.1 Les monocytes

Le nombre total de monocytes est significativement plus élevé chez les patients fracturés que chez les patients contrôles (Cf préambule et Figure 15). En revanche, l'expression d'HLA-DR au sein des monocytes est significativement plus basse dès J0 comparativement aux contrôles (MFI 8572 [4834-13156] vs 19741 [13004-23357] respectivement ; p=0.001). Le niveau d'expression d'HLA-DR le plus faible se situe à J1 avant de remonter progressivement jusqu'à M6 ou la MFI n'est plus significativement différente des contrôles, bien que toujours légèrement plus basse (MFI 11459 [7956-16527] vs 19741 [13004-23357] respectivement ; p=0.06) (Figure 17A). Il n'y a pas de différence d'expression d'HLA-DR au sein des monocytes entre les individus morts et les patients ayant survécu post-fracture (Figure 17B).

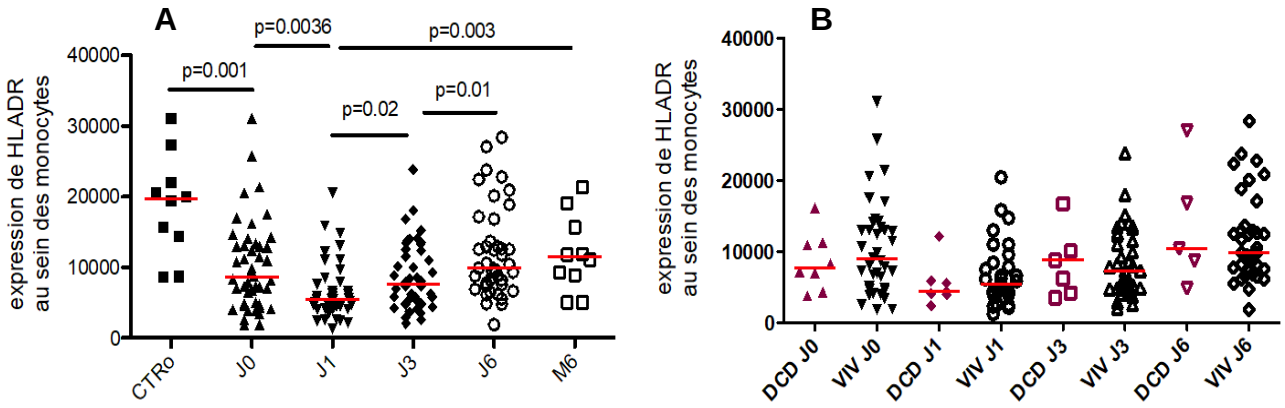


Figure 17 : Expression de HLA-DR au sein des monocytes en analyse longitudinale (**A**) et en comparaison vivant/décédé (**B**). Résultats exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo, contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

Au décours de la fracture, on note des modifications transitoires de répartition des sous- classes de monocytes. Ainsi, le pourcentage de monocytes non conventionnels (CD14-CD16+) diminue de J0 à J1 avant de se normaliser comparativement aux contrôles dès J3 (2,9% [1,8-6] à J1 vs 5,8% [3,6-10,8] pour les contrôles ; p=0.02) (Figure 18E) Les monocytes intermédiaires (CD14+CD16+) vont quant à eux augmenter jusqu'au à J3 avant de se normaliser (Figure 18C). Enfin les monocytes conventionnels (CD14+CD16-) restent stables jusque J1 avant de diminuer très transitoirement à J3 (86,7% [79,8-89,9] à J0 vs 77,8% [69,1-85,9] à J3 ; p=0,0016) (Figure 18A)

La comparaison entre les patients ayant survécu à la fracture et les patients décédés retrouve un pourcentage plus important de monocytes conventionnels à J1 chez les patients survivants que chez les morts (86,6% [79,5-90,2] vs 77,3% [33,7-85,4] respectivement ; p=0.04) (Figure 18B). Le pourcentage de monocytes intermédiaires et non conventionnels au contraire, est plus bas chez les survivants que chez les décédés au même temps post-opératoire (intermédiaires : 4,5% [2,9-8] vs 8,1% [4,7-10,6] respectivement ; p=0.08 et non conventionnels : 2,7% [1,7-4,8] vs 10,4% [4,8-25,8] respectivement ; p=0.003) (Figure 18D et 18F).

L'ensemble de ces modifications phénotypiques suggèrent l'acquisition d'un profil pro-inflammatoire des monocytes au décours de la fracture. Ce phénomène est très transitoire et semble plus marqué chez les patients décédés que chez les patients survivants.

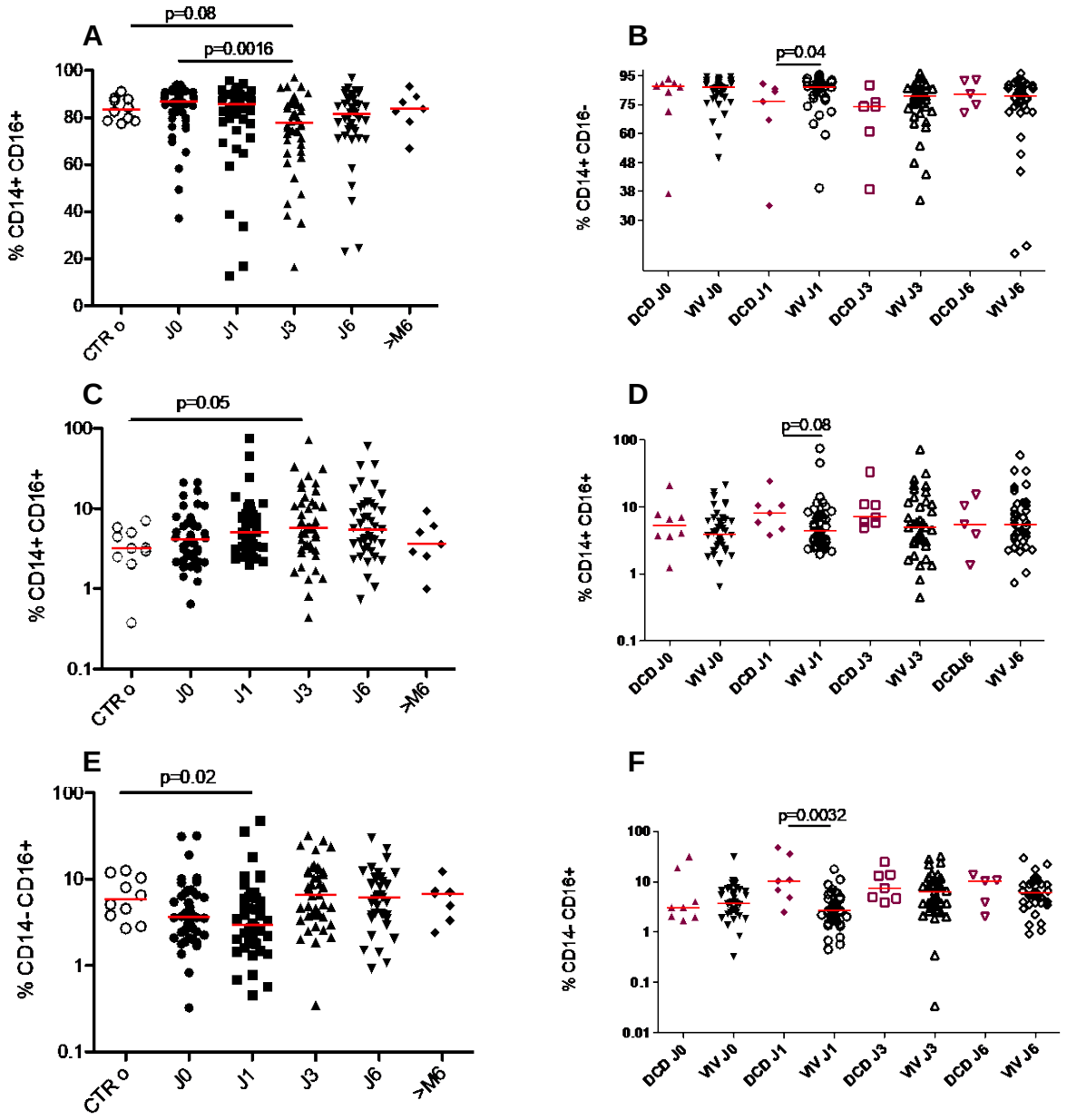


Figure 18: Analyse des sous populations monocytaires. Monocytes conventionnels CD14+ CD16- **(A, B)**, monocytes intermédiaires CD14+ CD16+ (**C, D**), monocytes non conventionnels (**E, F**) en analyse longitudinale (**A, C, E**) et en comparaison vivant/décédé (**B, D, F**). Résultats exprimés en %, comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

L’expression du CX3CR1 au sein des 3 sous populations monocytaires et en particulier au sein des monocytes non conventionnels, diminue également transitoirement au décours de la fracture pour atteindre son minimum à J1. Elle remonte ensuite progressivement pour se normaliser à 6 mois comparativement aux contrôles (Figure 19 A, C, E). Parallèlement, l’expression de CCR2 suit la tendance inverse avec une augmentation transitoire maximale à J1 avant décroissance et normalisation à J6. Cette augmentation transitoire de l’expression de CCR2 s’observe dans les 3 sous populations mais est particulièrement significative au sein des monocytes conventionnels. Le maximal de l’expression de CCR2 s’observe à J1 comparativement aux contrôles et à J6 (MFI 849 [637-1211] vs 442 [248-728] et 585 [434-757] respectivement ; p=0.002 et p=0.001 respectivement) (Figure 20 A,C,E)). Aucune différence significative dans l’expression de CX3CR1 et de CCR2 n’est retrouvée entre les patients décédés et survivants quelles que soient les sous-populations étudiées (Figure 19 B, D, F et 20 B, D, F))

Ces résultats sont en faveur d’un recrutement massif des monocytes conventionnels en provenance de la moelle osseuse ainsi que de leur migration, précoce et transitoire, vers le site inflammatoire de par l’hyper-expression de CCR2. En revanche, la migration des monocytes non conventionnels vers les cellules endothéliales et les vaisseaux est probablement altérée, comme le reflète la sous-expression de CX3CR1.

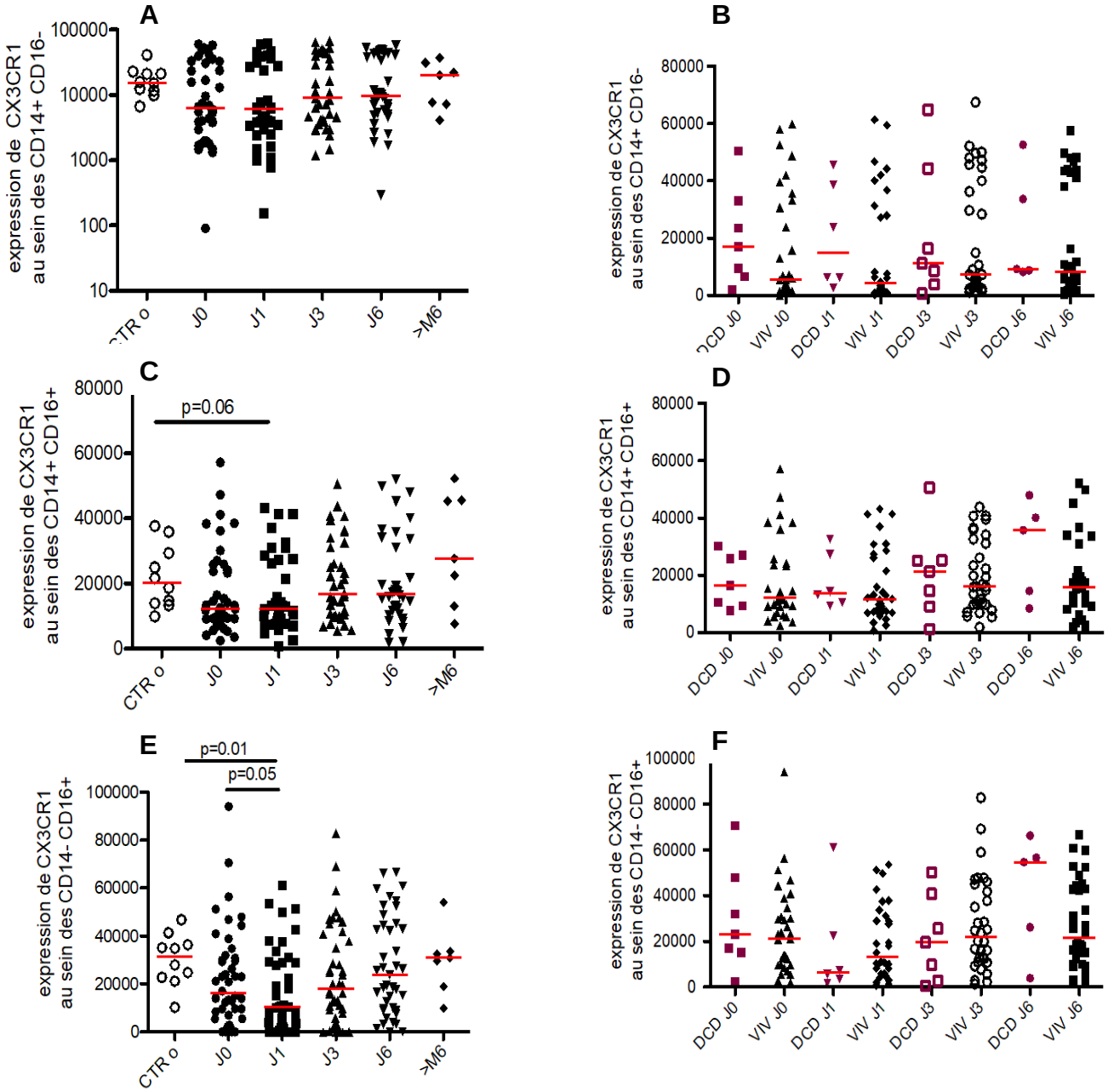


Figure 19 : Analyse de l'expression de CX3CR1 au sein des sous populations monocytaires. Monocytes conventionnels CD14+ CD16- **(A, B)**, monocytes intermédiaires CD14+ CD16+ (**C, D**), monocytes non conventionnels (**E, F**) en analyse longitudinale (**A, C, E**) et en comparaison vivant/décédé (**B, D, F**). Résultats exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

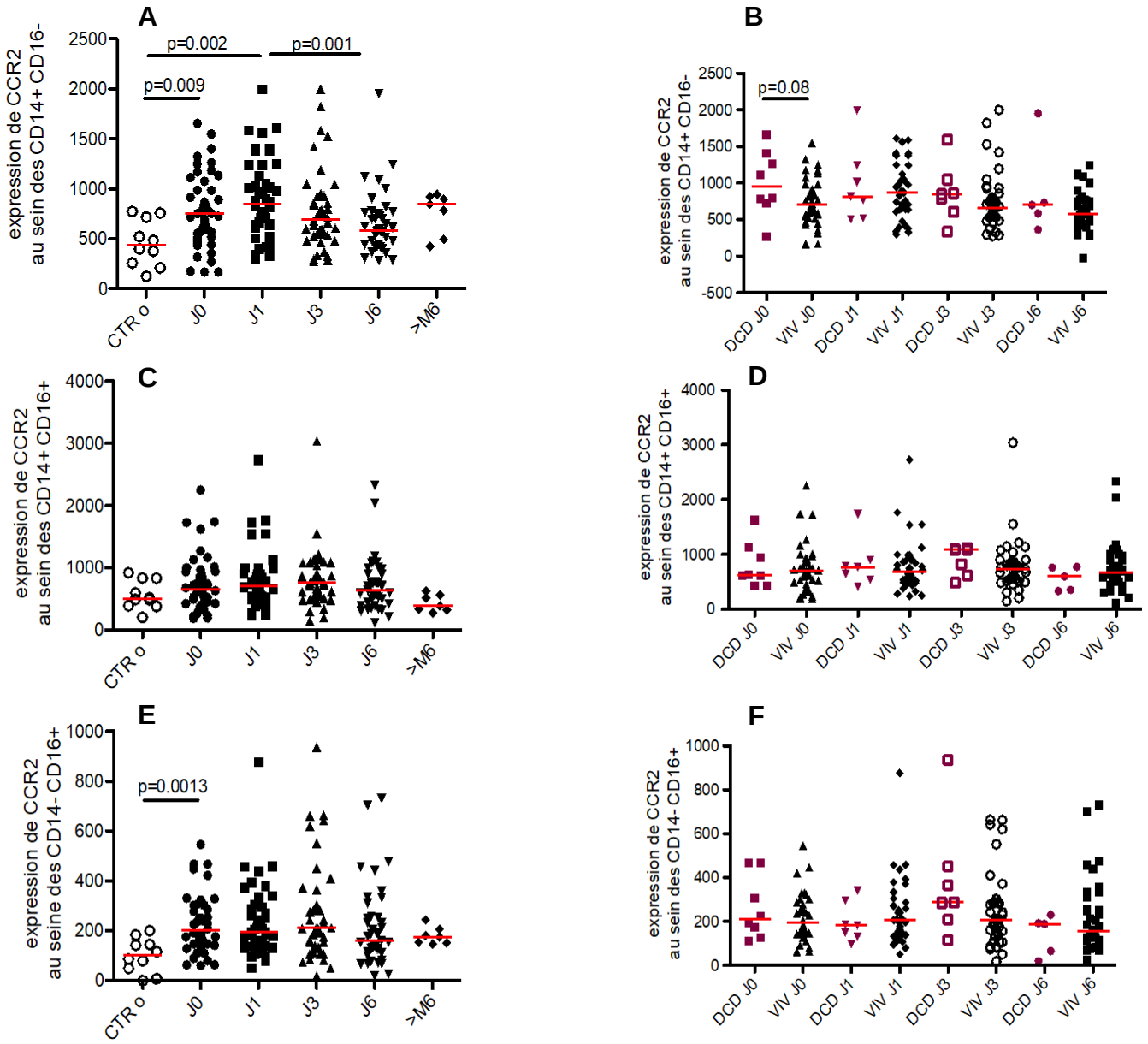


Figure 20 : Analyse de l'expression de CCR2 au sein des sous populations monocytaires. Monocytes conventionnels CD14+ CD16- **(A, B)**, monocytes intermédiaires CD14+ CD16+ (**C, D**), monocytes non conventionnels (**E, F**) en analyse longitudinale (**A, C, E**) et en comparaison vivant/décédé (**B, D, F**). Résultats exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

1.2 Les polynucléaires neutrophiles

Le pourcentage de polynucléaires neutrophiles est significativement plus élevé dès J0 comparativement aux contrôles. Il reste stable entre J0 et J1 avant de revenir au niveau des contrôles à J3 (contrôles 12% [7,8-18] vs J0 23,9% [12,5-33]; p=0.03 et J1 24,6% [12,3-36,6] vs J3 14,4% [9,2-21,1]; p=0.01) (Figure 21A). Aucune différence n'a été retrouvée en termes de pourcentage et de nombre absolu de neutrophiles entre les patients décédés et survivants (Figure 21B)

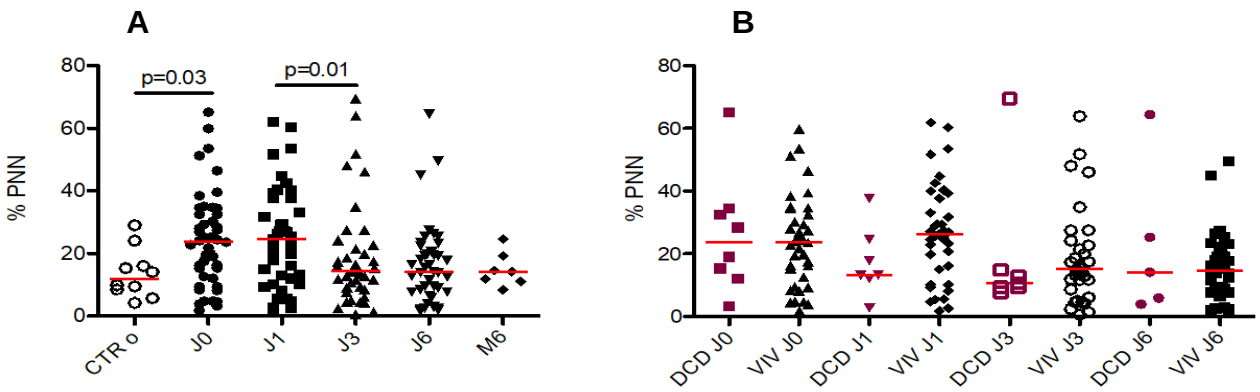


Figure 21 : Comparaison de la proportion de PNN en analyse longitudinale (A) et en comparaison survivant/décédés (B). Résultats exprimés en %, comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

De même l'analyse des sous-types de polynucléaires neutrophiles ($CD16^{+}CD62L^{high}$ et $CD16^{+}CD62L^{low}$) ne montre aucune différence que ce soit en analyse longitudinale post fracture ou entre les patients décédés et les survivants (Figure 22.)

Ainsi, le recrutement des polynucléaires neutrophiles, probablement par un phénomène de démargination est un élément supplémentaire en faveur de l'état pro-inflammatoire majeur induit pas la fracture

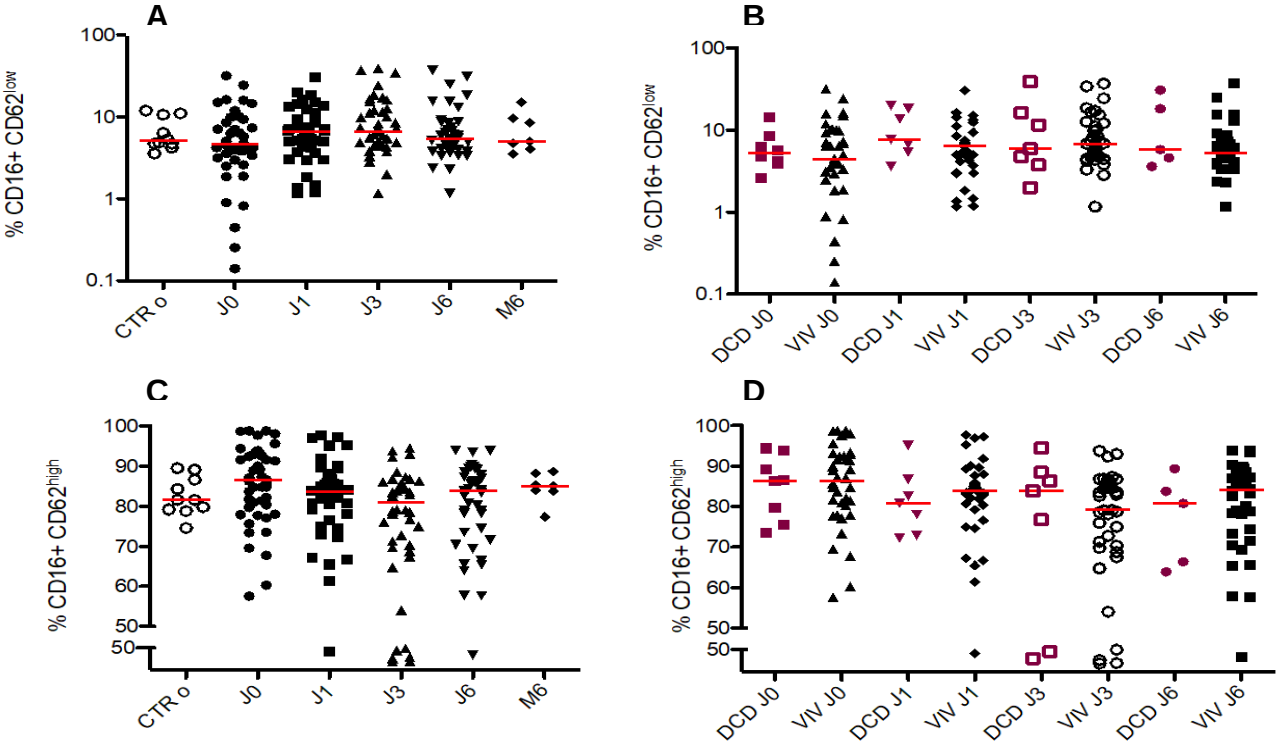


Figure 22 : Analyse des sous populations de polynucléaires neutrophiles CD16% CD62^{low} **(A, B)** et CD16+ CD62^{high} (**C, D**) en analyse longitudinale (**A, C**) et en comparaison vivant/décédé (**B, D**). Résultats exprimés en %, comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

2. Immunité adaptative

2.1 Lymphocytes CD4+ et CD8+

L'analyse longitudinale révèle une lymphopénie transitoire au sein du compartiment LT CD4+ et CD8+. Cette lymphopénie est significative dès J0 comparativement aux contrôles (CD4+ : 409/mm^3 [323-574] vs 744/mm^3 [342-1059] respectivement ; p=0,03 CD8+ : 180/mm^3 [116-269] vs 357/mm^3 [227-436] respectivement ; p=0,02), reste stable à J1 puis le taux de LT CD4+ et CD8+ remonte progressivement jusqu'à J6 (CD4+ : J1 393/mm3 [286-575] vs J6 636/mm^3 [494-838]; p<0,0001. CD8+ : J1

167/mm3 [118-236] vs J6 246/mm^3 [173-310]; p=0,003) (Figure 23A et C). Aucune différence n'est retrouvée entre les patients décédés et survivants post fracture (Figure 23B etD).

Cette lymphopénie CD4+ et CD8+ est un premier élément en faveur d'un état suppressif, précoce et transitoire, au sein du compartiment adaptatif au décours immédiat de la fracture.

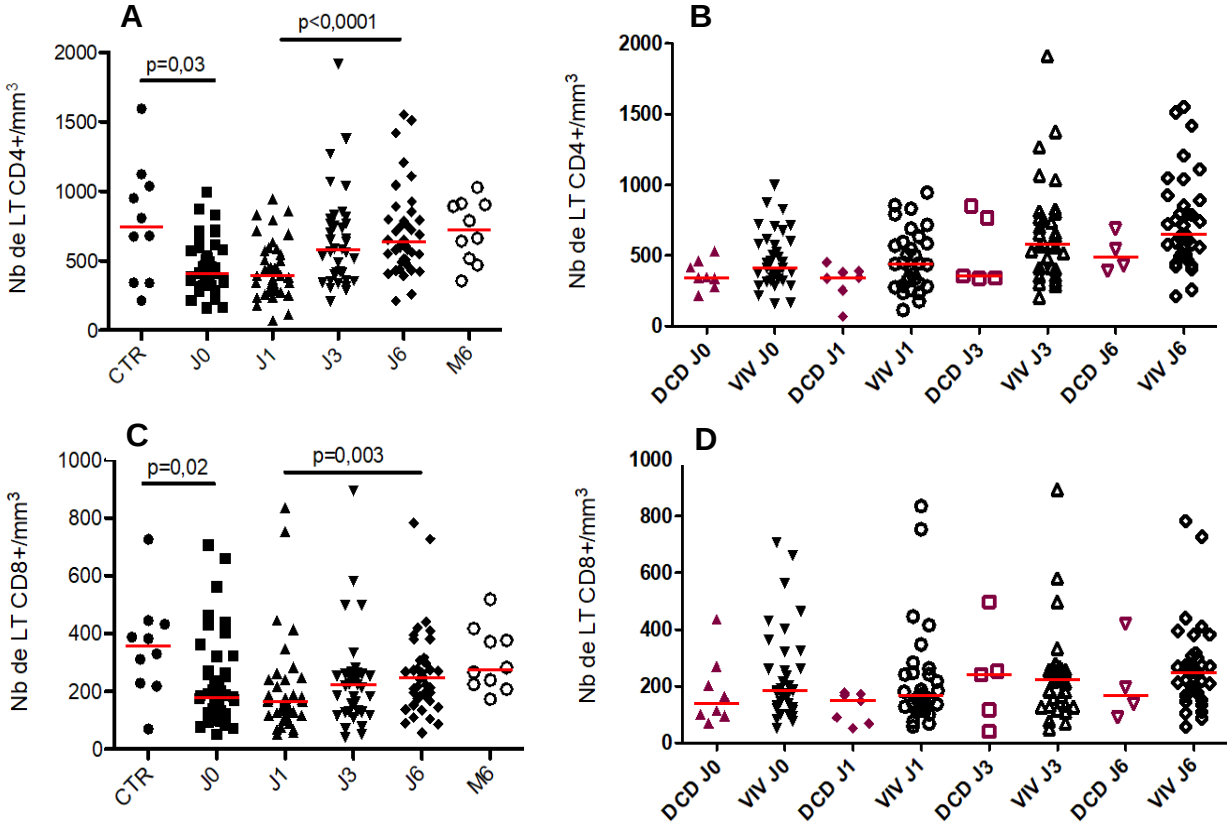


Figure 23 : Numération des lymphocytes T (LT) CD4+ et CD8+ en analyse longitudinale (**A, C**) et en comparaison vivant/décédé (**B, D**). Résultats exprimés nombre de cellules/mm^3, comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTR : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

2.2 Lymphocytes T régulateurs

Parallèlement à la lymphopénie CD4+, on note une diminution transitoire du nombre de lymphocytes T régulateurs $CD127^{low}CD25^{high}FOXP3^{+}$. Cette diminution est significative et maximale dès J0 comparativement aux contrôles (5,1/mm^3 [3,4-5,7] vs 9,6/mm^3 [8,1-17,1] respectivement ; p=0,0002). Le taux de LTreg remonte ensuite progressivement jusque J6 ou il est à nouveau comparable aux contrôles (10,8/mm^3 [3,7-16,1] vs 9,6/mm^3 [8,1-17,1] respectivement ; p=0,4) (Figure 23A). Cependant, la proportion de LTreg au sein des LT CD4+ reste la même (Figure 24C). Là encore aucune différence n'est retrouvée entre les décédés et les survivants (Figure 24B et D).

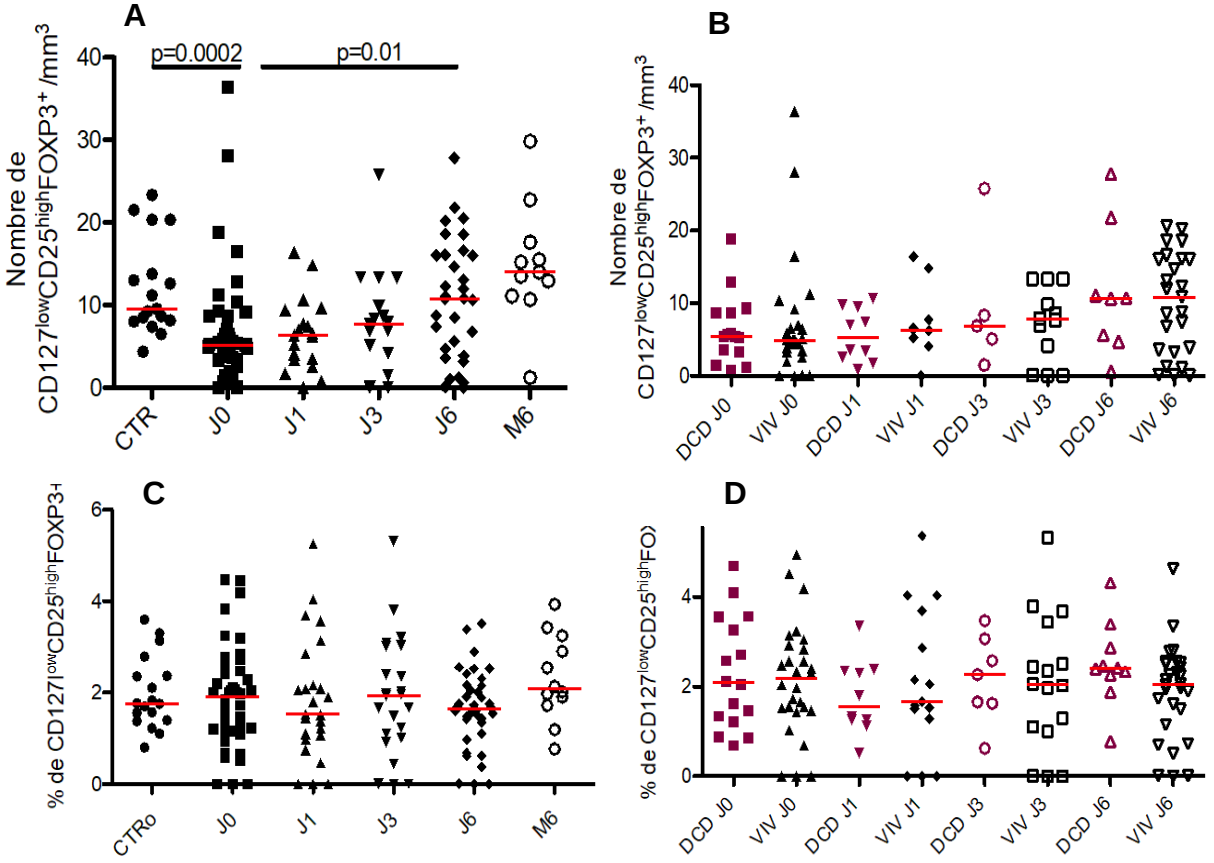


Figure 24 : Numération des lymphocytes T régulateurs (LTreg) $CD127^{low}$ $CD25^{high}$ FOXP3+ en analyse longitudinale (**A**) et en comparaison vivant/décédé (**B**). Proportion de LTreg au sein des LTCD4+ en analyse longitudinale (**C)** et en comparaison vivant/décédé (**D**). Résultats exprimés nombre de cellules/mm^3 et%, comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTR : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

L'analyse de la sous-population CD15s^{+} des LTreg (décrits comme les plus régulateurs des Treg [245]) affiche une tendance non significative à l'augmentation de CD127^{low}CD25^{high}FOXP3^{+}CD15s^{+} chez les patients survivants à la fracture (Figure 25).

Ces résultats suggèrent qu'il existe une phase « immunosuppressive » transitoire dans les premiers jours post-fracture et que cette phase suppressive aurait tendance à être plus marquée chez les patients survivants.

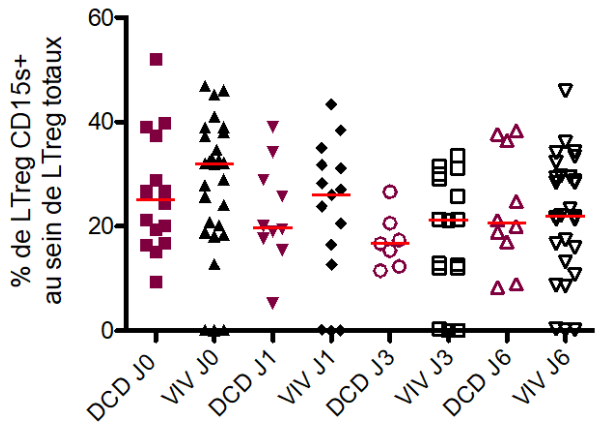


Figure 25 : Proportion de LTreg CD15s+ au sein des CD127^{low} CD25^{high} FOXP3+ en comparaison vivant/décédé. Résultats exprimés en %, comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

3. Analyse des corécepteurs

Les corécepteurs activateurs et inhibiteurs jouent un rôle très important dans la régulation de l'immunité et notamment dans la régulation de l'activation lymphocytaire. Nous avons émis l'hypothèse que l'expression de ces corécepteurs pouvait être modifiée par la FESF mais également qu'ils pouvaient être impliqués dans le pronostic du patient en ne permettant pas le retour à l'homéostasie immunitaire.

3.1 Expression des corécepteurs au sein des monocytes

L'expression des corécepteurs LAG-3 et PD-1 suit une évolution paradoxale au sein des monocytes. En effet, alors que l'expression de PD-1 diminue progressivement jusqu'à J1 avant de revenir progressivement à la normale (Figure 26C), l'expression de LAG-3 augmente transitoirement avec un maximal d'expression observé à J3 (Figure 26A).

De plus, l'expression de PD-1 est plus significativement plus importante chez les patients décédés que chez les patients survivants à J1, J3 et J6 (MFI J1 : 1136 [843-238] vs 660 [562-781] ; p=0.006 ; MFI J3 : 1650 [1525-2550] vs 797 [695-1088] ; p=0.0009 ; MFI J6 : 1348[1125-2739] vs 900 [716-1195] ; p=0.007) (Figure 26D)

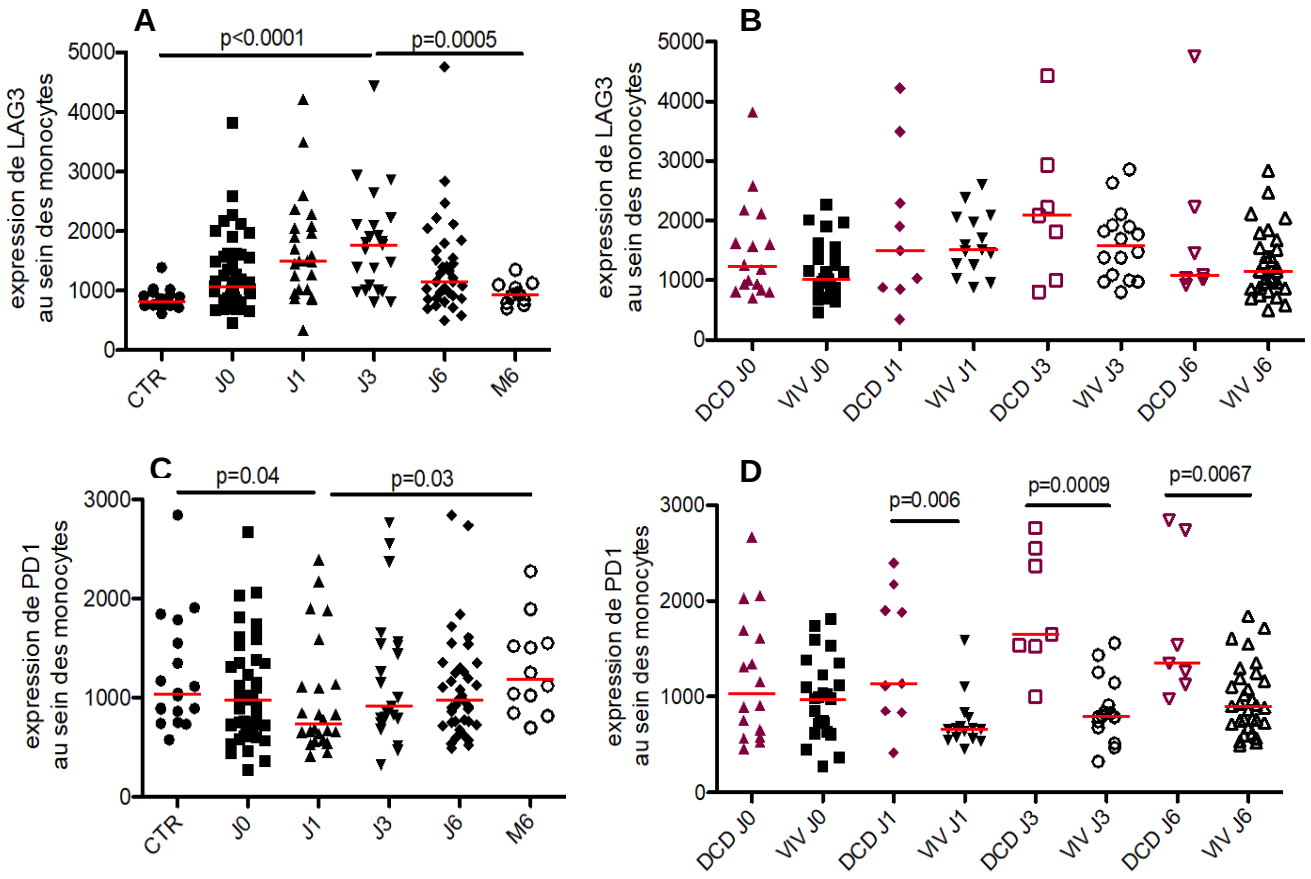


Figure 26 : Expression de LAG-3 (A, B) et de PD-1 (C, D) au sein des monocytes en analyse longitudinale (**A, C**) et en comparaison vivant/décédé (**B, D**). Résultats exprimés moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTR : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

L'expression du corécepteur activateur 4-1BB au sein des monocytes reste stable au décours de la fracture sur l'analyse longitudinale (Figure 27A). En revanche, les patients décédés présentent une expression de 4-1BB significativement plus importante que les patients survivants de J0 à J6 (MFI J0 : 163 [133-356] vs 113 [87-143] ; p=0.002 ; MFI J1 : 240 [151-449] vs 105 [75-139] ; p=0.001 ; MFI J3 : 411 [320-468] vs 112 [69-136] ; p=0.0006 ; MFI J6 : 299 [161-510] vs 123 [95-138] ; p=0.0003) (Figure 27B)

L'expression de 2-B4 diminue progressivement et transitoirement jusque J1 avant de revenir à un niveau d'expression comparable aux contrôles à M6 (Figure 27C). Les

patients décédés expriment moins fortement le 2-B4 comparativement aux contrôles, notamment à J3 (MFI J3 : 113 [79-180] vs 392 [221-464] ; p=0.02) (Figure 27D)

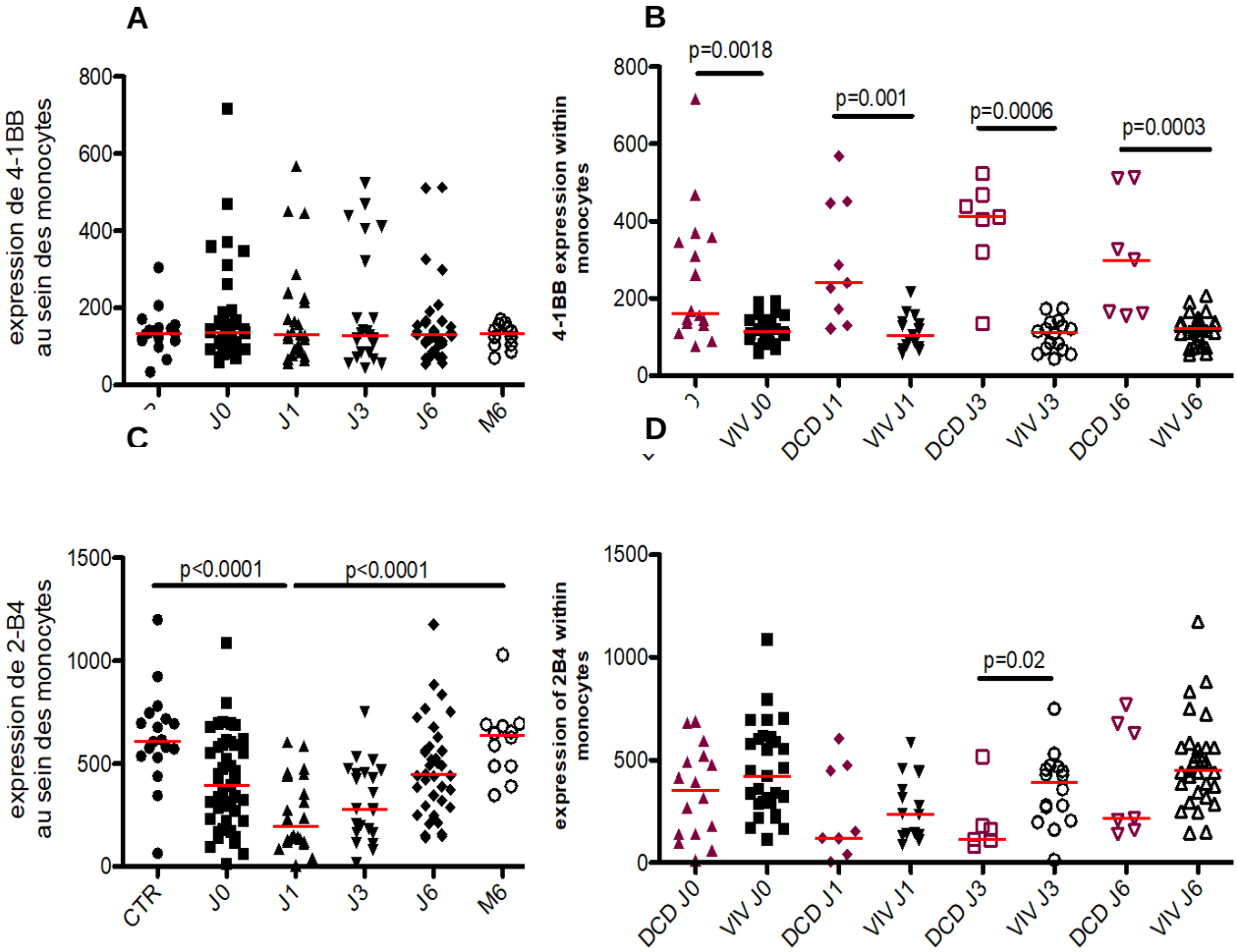


Figure 27 : Expression de 4-1BB (CD137) (A, B) et de 2-B4 (CD244) (C, D) au sein des monocytes en analyse longitudinale (**A, C**) et en comparaison vivant/décédé (**B, D**). Résultats exprimés moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTR : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

L’analyse des corécepteurs exprimés par les monocytes est complexe car leur fonction est mal connue. Le PD-1 est le corécepteur le plus étudié au sein des monocytes. Il est en effet exprimé par des monocytes activés. L’analyse longitudinale de l’expression de PD-1 au sein des monocytes montre une décroissance progressive qui pourrait refléter une diminution du taux de monocytes activés corroborant l’analyse de HLA-DR effectuée ci-dessus (Figure 17). Le niveau d’expression de PD-1 est plus élevé chez les patients décédés suggérant un niveau d’activation monocytaire plus importante chez ces patients. Ces résultats corroborent les données de la littérature dans le choc septique. En effet, les patients ayant un mauvais pronostic dans le sepsis surexpriment PD-1 au sein des monocytes [99, 246, 247]. L’ensemble des résultats obtenus sont en faveur d’une activation monocytaire puisque l’encemble des récepteurs étudiés voit leur expression modulée au décours de la fracture. De plus, l’expression différentielle de PD-1, 4-1BB et 2-B4 entre les patients survivants et décédés nous mène à émettre l’hypothèse qu’il existe bien un défaut de régulation chez les patients de mauvais pronostic.

3.2 Expression des corécepteurs au sein des LT

L’expression de certains corécepteurs activateurs (2-B4) et inhibiteurs (PD-1, LAG-3, CTLA-4) ont été étudiés au sein des populations LT CD4+ et CD8+ mémoires.

L’expression de 2-B4 au sein des LT CD8+ mémoires diminue transitoirement dès J0 pour atteindre son minimum à J1 comparativement aux contrôles (MFI J1 : 99,3 [27,4-136] vs MFI contrôles 223 [169-245] ; p=0.0008). Son expression remonte progressivement entre J1 et M6 pour revenir au niveau des contrôles (MFI J1 : 99,3 [27,4-136] vs MFI M6 274 [174-300] ; p=0.0001) (Figure 28A). Aucune différence n’est retrouvée entre les patients décédés et les contrôles (Figure 28B).

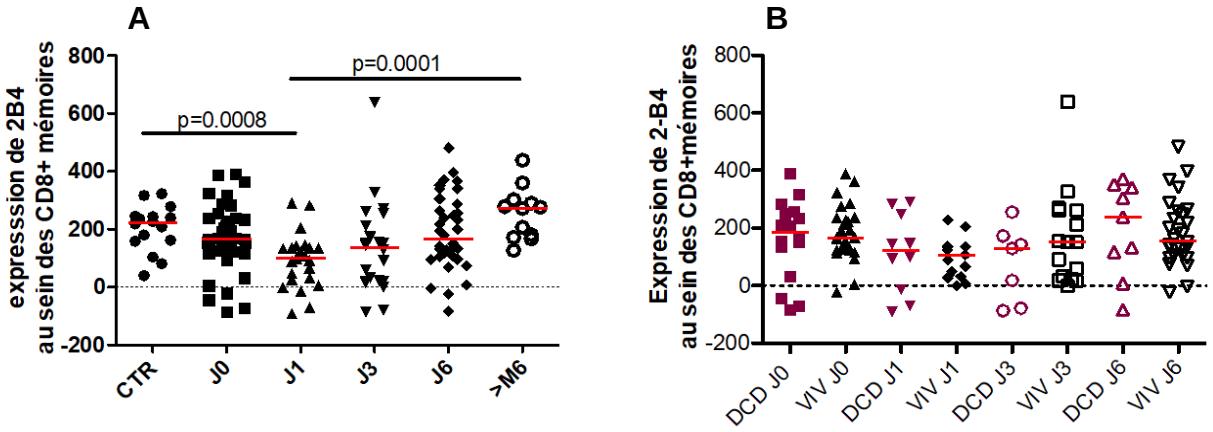


Figure 28 : Expression de 2-B4 (CD244) au sein des LT CD8+ mémoires en analyse longitudinale (**A**) et en comparaison vivant/décédé (**B**). Résultats exprimés moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTR : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

L'expression de LAG-3 augmente transitoirement et significativement, aussi bien dans le compartiment CD4+ mémoire que CD8+ mémoire. Il atteint son maximum d'expression à J1 avant de diminuer progressivement et de revenir au niveau des contrôles à M6 (Figure 29A et 30A). Là encore, aucune différence n'est retrouvée entre les patients décédés et survivants (Figure 29B et 30B)

L'expression de PD-1 (autre corécepteur inhibiteur) au sein des LT CD8+ mémoire a tendance à suivre la même évolution que LAG-3 (augmentation transitoire) sans que ces résultats ne soient significatifs (Figure 30C). De même, il n'y a pas de différence d'expression significative entre les patients morts et les vivants (Figure 30D).

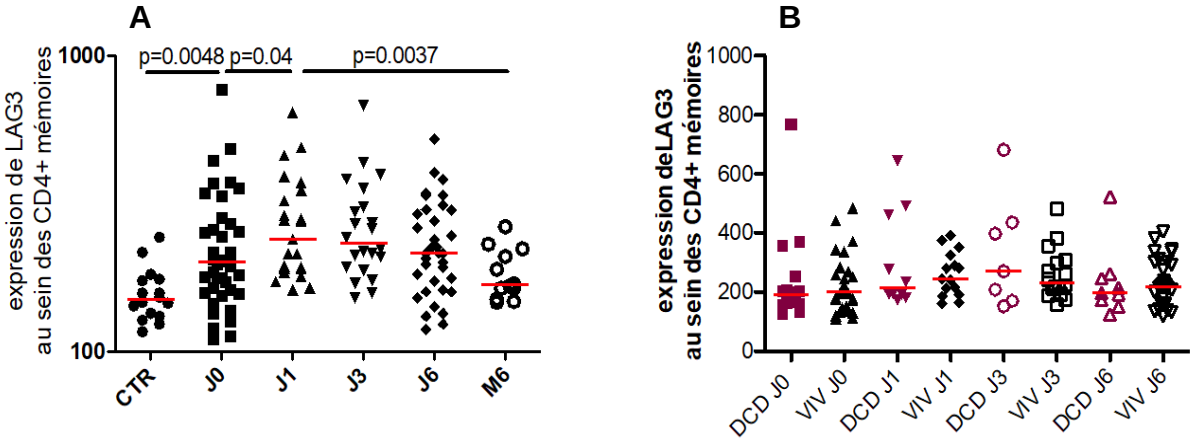


Figure 29 : Expression de LAG-3 au sein des LT CD4+ mémoires en analyse longitudinale (**A**) et en comparaison vivant/décédé (**B**). Résultats exprimés moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTR : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

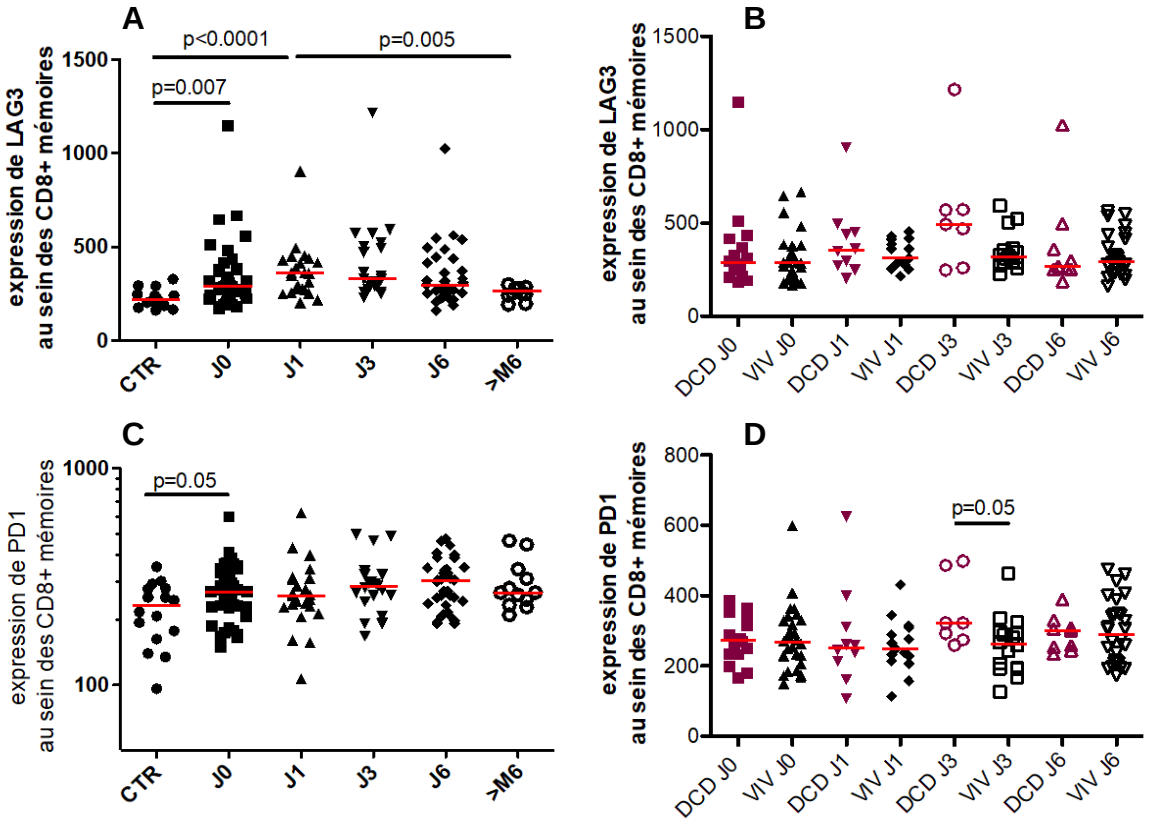


Figure 30: Expression de LAG-3 (A, B) et de PD-1 (C, D) au sein des LT CD8+ mémoires en analyse longitudinale (**A, C**) et en comparaison vivant/décédé (**B, D**). Résultats exprimés moyenne d'intensité de fluorescence (MFI), comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTR : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

On retrouve donc une augmentation transitoire des corécepteurs inhibiteurs et une diminution du corecepteur activateur 2-B4 au sein des LT dans l'analyse longitudinale. Ces résultats sont en faveur d'une phase immunosuppressive survenant précocement au sein du compartiment adaptatif au décours immédiat de la fracture avant un retour progressif à l'homéostasie immunitaire.

Conclusion de la première partie.

L'analyse phénotypique réalisée en longitudinal post fracture et en comparant les patients décédés et survivants a renforcé notre hypothèse de boucle de régulation (Figure 31). En effet, on retrouve une phénomène pro-inflammatoire transitoire sur le versant immunitaire inné avec : 1. Une augmentation des polynucléaires neutrophiles totaux 2. une augmentation des monocytes pro-inflammatoires intermédiaires et non conventionnels au détriment des monocytes conventionnels. 3. Une augmentation de l'expression de CCR2 témoignant probablement d'une migration des monocytes vers le site inflammatoire [248] et une diminution de l'expression de CX3CR1, phénomène identique à celui retrouvé dans le choc septique [249] 4. Une expression différentielle des corécepteurs entre les patients décédés et survivants. Sur le versant adaptatif, on retrouve un profil plutôt suppressif associant : 1. Une lymphopénie LT CD4+ 2. Une augmentation de l'expression des corécepteurs inhibiteurs PD-1 et LAG-3. 3. Une diminution du corécepteur activateur 2-B4.

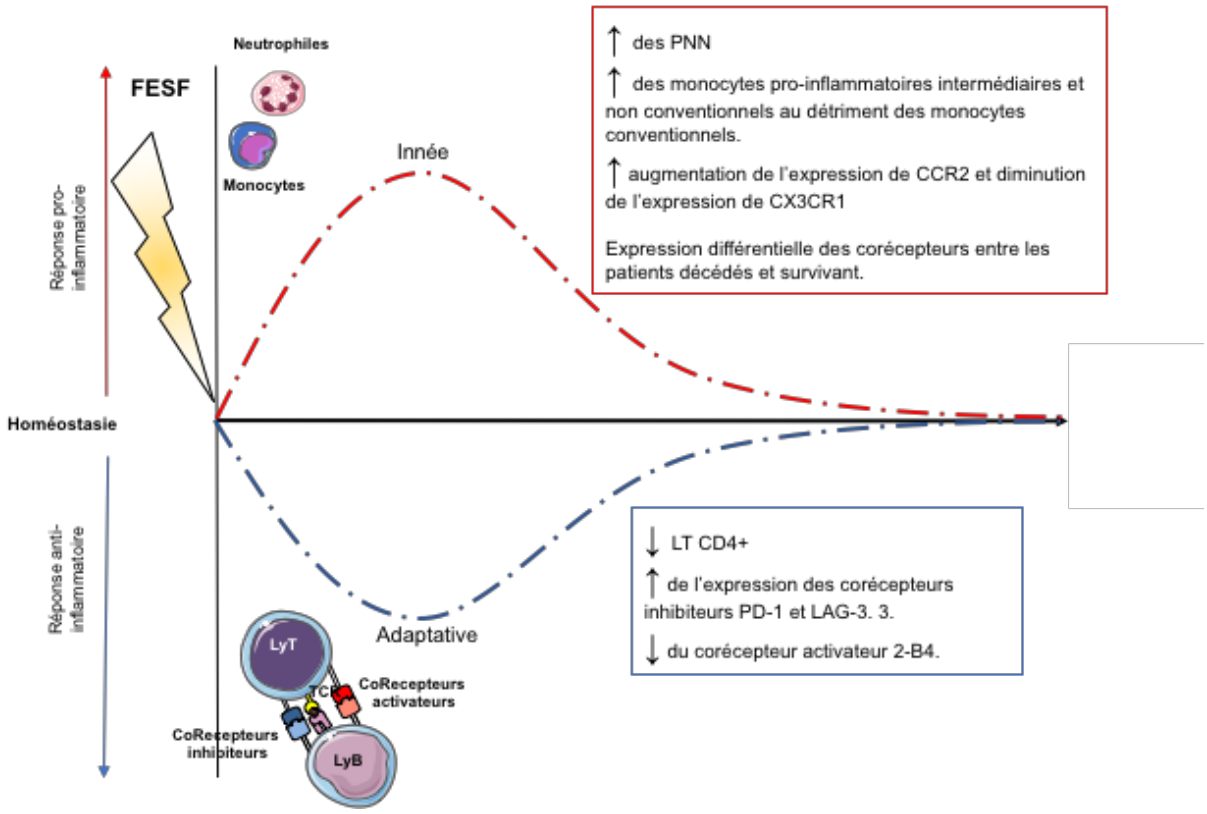


Figure 31 Synthèse de l'analyse phénotypique des patients suite à une FESF. On remarque dans les heures qui suivent la FESF une activation du système immunitaire aboutissant à un état pro-inflammatoire intense essentiellement lié aux modifications au sein du compartiment immunitaire inné. En parallèle des phénomènes immunosuppressifs ont lieu au sein de compartiment adaptatif. Tous ces phénomènes sont transitoires et, pour la plupart des patients, s'atténuent pour revenir à l'état homéostatique dès la fin de la première semaine.

Malgré ces phénomènes, Ces analyses phénotypiques ne nous ont pas apporté suffisamment d'éléments permettant d'expliquer la différence d'évolution entre les patients décédés et les patients survivants à la fracture. Notre hypothèse initiale était que les patients qui décèdent à distance de la fracture sont ceux qui n'arrivent pas à réguler l'hyper-inflammation initiale et à retourner à l'homéostasie.

Partie 2 : Fonctionnalité monocytaire et reprogrammation du monocyte au cours de la FESF

L'étude phénotypique réalisée en première partie ne nous a pas apporté suffisamment d'éléments permettant d'expliquer la différence d'évolution entre les patients décédés et les patients survivants à la FESF. Notre hypothèse initiale était que les patients qui décèdent à distance de la fracture sont ceux qui n'arrivent pas à réguler l'hyper-inflammation initiale et à retourner à l'homéostasie.

Notre équipe a montré dans une étude antérieure, que le taux plasmatique préopératoire de néoptérine était prédictif de mortalité mais également que ce taux restait élevé plus longtemps chez les patients décédés comparativement aux survivants. La néoptérine étant synthétisée par les monocytes sous l'influence de l'IFN-γ nous avons émis l'hypothèse qu'il existait au sein de ce compartiment cellulaire un défaut de fonctionnalité et de reprogrammation entrainant une impossibilité à revenir à l'homéostasie et étant à l'origine du décès du patient à long terme. Nous avons tout d'abord comparé, entre les patients décédés et survivants, la capacité des monocytes à produire des cytokines sous l'influence d'un deuxième stress (le premier étant la fracture) modélisé par une stimulation en LPS. Nous avons ensuite souhaité comparer les capacités de reprogrammation monocytaire dans ces deux groupes. Pour se faire, nous avons d'abord étudié l'expression différentielle d'une dizaine de gènes impliqués dans le stress oxydant et l'inflammasome. Les résultats obtenus étant encourageants, nous avons approfondi cette piste en réalisant sur monocytes triés, une analyse transcriptomique avec une attention particulière sur les gènes impliqués dans ces mêmes voies.

1. Induction de cytokines par les monocytes après stimulation par le LPS

Dans ce modèle, les PBMCs de patients ayant survécu ou étant décédés à distance de la fracture ainsi que des patients contrôles ont été mis en culture et stimulé en LPS afin d'évaluer leur capacité fonctionnelle de production cytokinique.

Les cellules de patients décédés sécrétaient une quantité significativement plus importante d'IL-6 que les patients survivants et cette différence d'induction était d'autant plus marquée pour les monocytes intermédiaires et non conventionnels (Conventionnels : 53% [22-73] vs 37% [25-43] ; p= 0,025. Intermédiaires : 61% [34-77] vs 14% [6-56] ; p=0,002. Non conventionnels : 14% [1-23] vs 6% [3-10] p=0,04) (Figure 32)

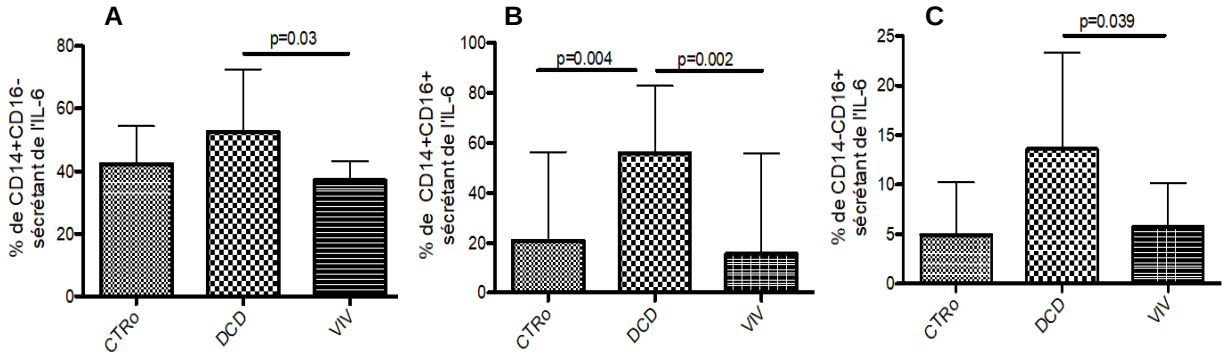


Figure 32 : Comparaison de la capacité de sécrétion d'IL-6 par les sous types de monocytes après stimulation par le LPS entre les contrôles (*n=10*), les patients décédés (*n=9*) et les survivants (*n=10*) à 6 mois. Monocytes conventionnels CD14+ CD16- (**A**), intermédiaires CD14+ CD16+ (**B**) et non conventionnels CD14- CD16+ (**C**). Résultats exprimés médiane [IQR]. Comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

Les mêmes tendances étaient retrouvées pour 2 autres cytokines pro-inflammatoires (l'IL-8 et l'IL-1β) au sein des monocytes intermédiaires et non conventionnels. En effet, le taux d'IL-8 était significativement plus élevé chez les patients décédés que chez les patients vivants (Intermédiaires : 41% [20-59 vs 17% [0,5-49] ; p=0,045. Non conventionnels : 8% [3-33] vs 4% [3-8] ; p=0,06) (Figure 33A et B). De plus, le taux d'IL-1β était significativement plus élevé chez les patients décédés que chez les patients vivants (Non conventionnels : 4% [1-17] vs 3% [1-7] ; p=0,08) (Figure 33C et D).

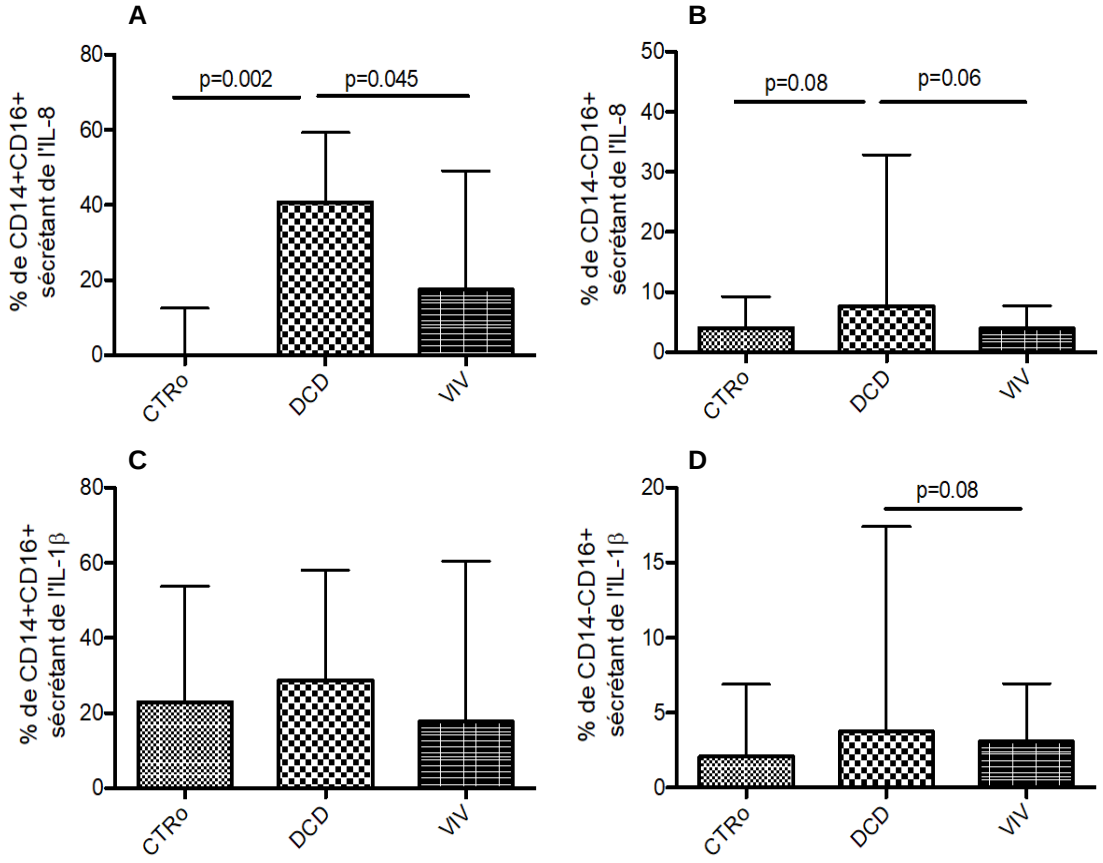


Figure 33 : Comparaison de la capacité de sécrétion d'IL-8 (A, B) et d'Il-1β (C, D) par les sous types de monocytes après stimulation par le LPS entre les contrôles (*n=10*), les patients décédés (*n=9*) et les survivants (*n=10*) à 6 mois. Monocytes intermédiaires CD14+ CD16+ (**A, C**) et non conventionnels CD14- CD16+ (**B, D**). Résultats exprimés médiane [IQR]. Comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

De manière intéressante, l'induction de cytokines pro-inflammatoires par les patients survivants avait tendance à être similaire à celui des patients contrôles (Figure 32 et 33)

En revanche, l'analyse des cytokines anti-inflammatoires sécrétées par les 3 groupes de patients montraient un profil inverse. En effet, la sécrétion de TGF-β par les patients décédés était significativement plus basse que chez les survivants (Conventionnels : 0% [0-0,1] vs 0,1% [0-1] ; p=0,006. Non conventionnels : 0% [0-1] vs 0,3% [0,1-1] ; p=0,04). De plus, la sécrétion d'IL-10 par les patients décédés était plus basse que chez les survivants (Conventionnels : 0,05% [0-0,8] vs 0,4% [0,02-2] ; p=0,09. Non conventionnels : 0,2% [0-0,7] vs 0,6% [0,3-1,4] ; p=0,005) (Figure 34). L'induction de cytokines pro-inflammatoires par les patients décédés avait tendance à être similaire à celui des patients contrôles.

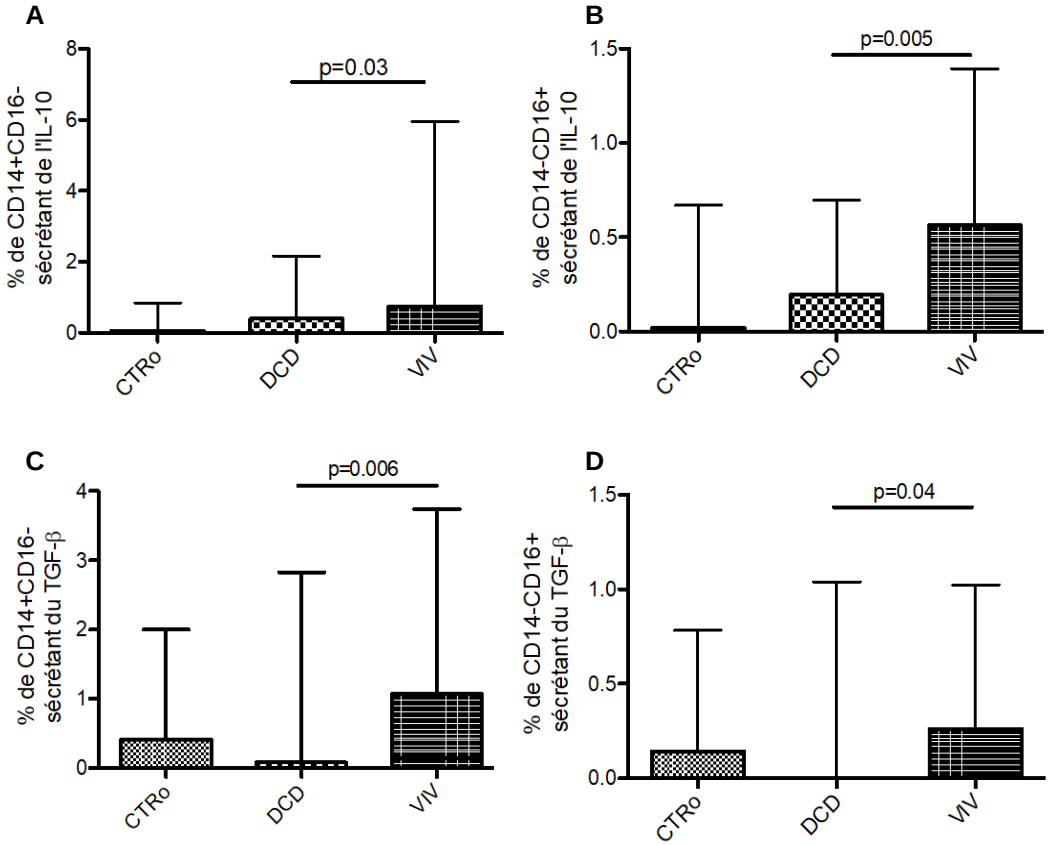


Figure 34 : Comparaison de la capacité de sécrétion d'IL-10 (A, B) et de TGF-β (C, D) par les sous types de monocytes après stimulation par le LPS entre les contrôles (*n=10*), les patients décédés (*n=9*) et les survivants (*n=10*) à 6 mois. Monocytes conventionnels CD14+ CD16- (**A, C**) et non conventionnels CD14- CD16+ (**B, D**). Résultats exprimés médiane [IQR]. Comparaison des médianes par le test de Mann Whitney. *CTRo : contrôle, DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

Ainsi, après stimulation en LPS, les patients survivants sécrétaient moins de cytokines pro-inflammatoires et plus de cytokines anti-inflammatoires que les patients décédés, suggérant une capacité des monocytes des patients survivants à acquérir des fonctions plus « suppressives » pouvant leur permettre de revenir à l'homéostasie. Les monocytes des patients décédés ont une capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires supérieure aux survivants et aux contrôles ce qui pourrait être délétère pour leur évolution clinique.

2. Expression différentielle des gènes impliqués dans le stress oxydant et l'inflammasome

Afin d'explorer la piste de la reprogrammation monocytaire, nous avons analysé l'expression de certains gènes, impliqués dans le stress oxydant et l'inflammasome, par qPCR sur des PBMCs de patients décédés et survivants à distance de la fracture. L'expression de HIF-1a (impliqué dans la reprogrammation monocytaire et le stress oxydant) chez les patients décédés était en moyenne 22 fois supérieure aux survivants. De plus, 2 gènes impliqués dans l'inflammasome étaient également surexprimés dans le groupe des patients décédés avec une moyenne de fold change à 34 pour NLRP3 et 191 pour l'IL-1β. En parallèle, l'expression des gènes TXNRD1 et TXNRD2, impliqués dans la protection contre le stress oxydatif, étaient sous-exprimés chez les patients décédés comparativement aux survivants avec une moyenne de fold change à -60 et -811 respectivement (Figure 35). De manière plus étonnante, HAMP (gène exprimé en condition inflammatoire et impliqué dans le métabolisme du fer) et KLF9 (facteur de transcription impliqué dans la genèse du stress oxydant) étaient tous les 2 sous-exprimés chez les patients décédés comparativement aux survivants (Figure 35).

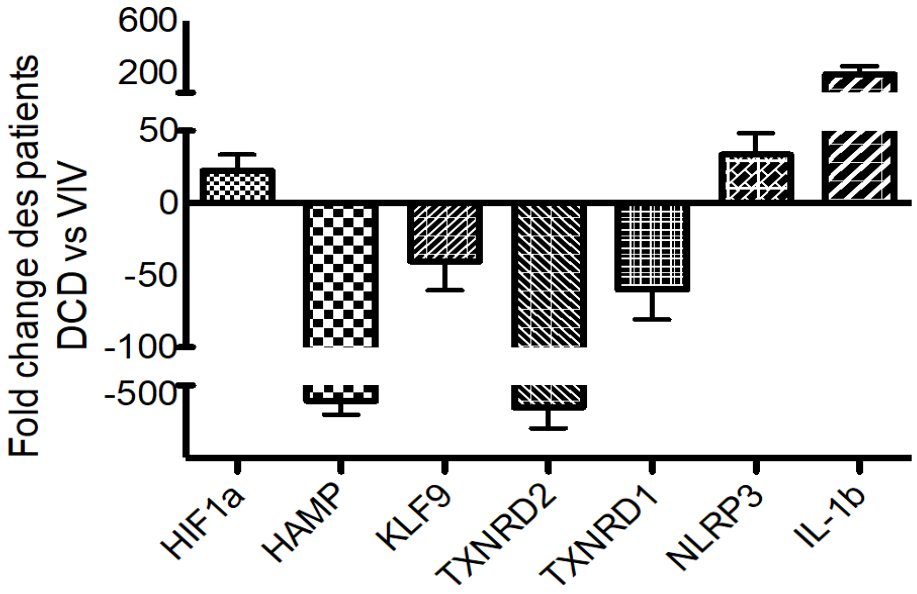


Figure 35 : Modification de l'expression des gènes d'intérêt (ARNm) chez les patients décédés (n=10) comparativement aux survivants (n=10). Résultats exprimés moyenne ± SEM [IQR]. *DCD : décédé à 6 mois, VIV : vivant à 6 mois*

Ces résultats nous montrent un différentiel d'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant et l'inflammasome entre les patients décédés et survivants à la fracture et sont en faveur d'une hyper-inflammation et d'un stress oxydant majoré chez les patients décédés. Bien que prometteurs, ces résultats restent insuffisants pour valider notre hypothèse selon laquelle les monocytes des patients décédés sont incapables de se reprogrammer pour revenir à l'état homéostatique. Nous avons donc souhaité étudier plus avant un potentiel défaut dans la reprogrammation du monocyte chez les patients décédés.

Pour cette raison nous avons réalisé une analyse transcriptomique, sur des monocytes CD14+ triés de patients survivants et décédés, selon deux conditions expérimentales : avec et sans restimulation par LPS.

Une analyse en dose réponse a été effectuée dans un premier temps afin de déterminer quelles étaient les meilleures conditions de stimulation (dose de LPS et

durée de stimulation) pour les monocytes CD14+ précédemment isolés par FACS. La dose optimale de LPS a été évaluée à 1µg/ml et la durée de stimulation à 4 heures.

Les monocytes de 12 patients et 6 contrôles ont ensuite été isolés par FACS et immédiatement mis en culture avec ou sans LPS. Après 4h, les cellules étaient récupérées, conditionnées sous forme de culot sec et conservées à -80°C dans l'attente de l'extraction d'ARN. Cette extraction, a été réalisée par la technique du Trizol. La qualité des échantillons était évaluée par la mesure des RIN.

Seuls les prélèvements homogènes et de bonne qualité (RIN>6) ont été retenus pour l'analyse transcriptomique. Quinze patients ont été inclus pour cette partie de l'étude (6 décédés, 5 survivants et 4 contrôles) pour un total de 74 échantillons (cf méthode pages 83-84)

Les prélèvements sont en cours d'analyse actuellement à la plateforme génomique de l'institut Cochin. Cette analyse comprendra plusieurs niveaux: comparaison des patients survivants et décédés, comparaison de la condition stimulée et non stimulée, comparaison des différents temps pré et postopératoires.

Conclusion de la deuxième partie

L'analyse de la fonctionnalité des monocytes nous a permis de montrer que face à une deuxième stimulation, les monocytes des patients décédés produisaient une quantité anormale de cytokines pro-inflammatoires après exposition au LPS comparativement aux survivants et aux contrôles. Les monocytes de patients survivants quant à eux, étaient capable de produire une quantité plus importante de cytokines anti-inflammatoires comparativement aux décédés et aux contrôles. Ces éléments sont en faveur d'une fonctionnalité anormale des monocytes chez les patients décédés. En effet, pour les patients survivants, nos résultats sont en faveur d'un phénomène de paralysie immunitaire proche de celui observé dans le sepsis [228]. Ce phénomène nécessite une reprogrammation du monocyte vers un phénotype anti-inflammatoire, permettant au système immunitaire de revenir rapidement à l'état homéostatique et ainsi de protéger le patient d'une évolution défavorable. Les monocytes des patients décédés au contraire, gardent une capacité d'activation trop importante, en lien avec un défaut de reprogrammation (Figure 36).

De plus, nous avons observé une expression différentielle importante de gènes impliqués dans le stress oxydant et l'inflammasome chez les patients décédés comparativement aux contrôles qui renforce notre hypothèse de défaut de reprogrammation monocytaire (Figure 36). Afin de confirmer cette hypothèse, une analyse transcriptomique plus détaillée de ces monocytes est en cours.

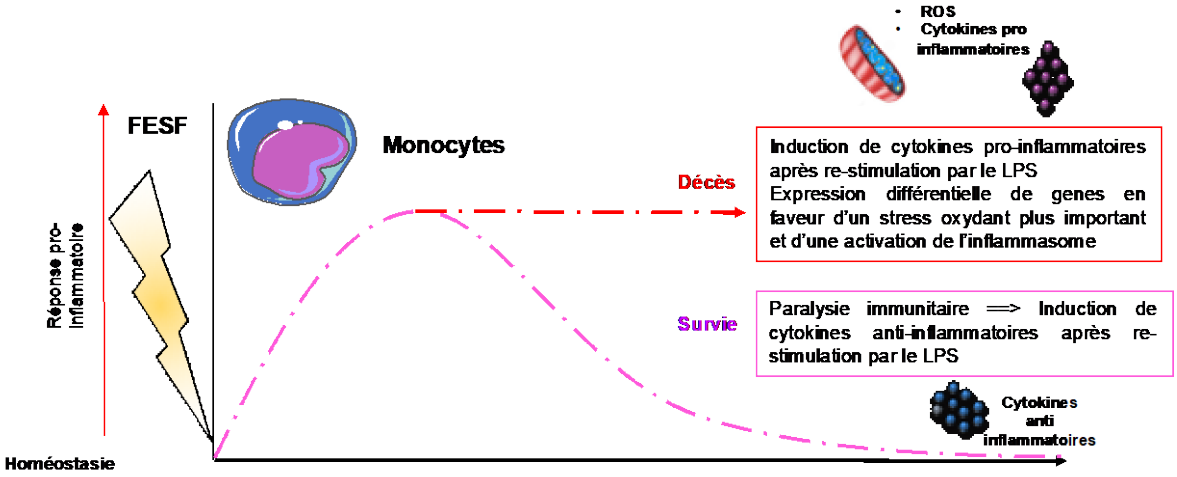


Figure 36 : Synthèse de l'étude de la fonctionnalité et de la reprogrammation du monocyte après une FESF. On remarque au sein des monocytes de patients décédés un état d'hyper-activation anormal, probablement en lien avec un défaut de reprogrammation monocytaire. Les monocytes de patients survivants au contraire, subissent un phénomène de paralysie immunitaire leur permettant le retour à l'homéostasie.

Partie 3 : fonctionnalité de la néoptérine

Notre équipe a pu mettre en évidence dans une précédente publication [194] que la néoptérine était prédictive de mortalité chez les patients âgés présentant une FESF. La néoptérine est une molécule synthétisée par les monocytes sous l'influence de l'IFN-γ. Hors, l'IFN-γ est également capable d'induire une autre voie métabolique au sein des monocytes qui est la voie des tryptophanes. Sous l'induction de l'IFN-γ, le monocyte active de manière concurrentielle la synthèse deux types d'enzyme que sont la guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 (GCH-1) et l'indoleamine 2,3- dioxygenase (IDO). La première aboutit à la synthèse de BH4 ou de néoptérine, la deuxième entraine la dégradation du tryptophane en différent métabolites comme la kynurenine, la sérotonine ou l'acide picolinique (Figure 37)

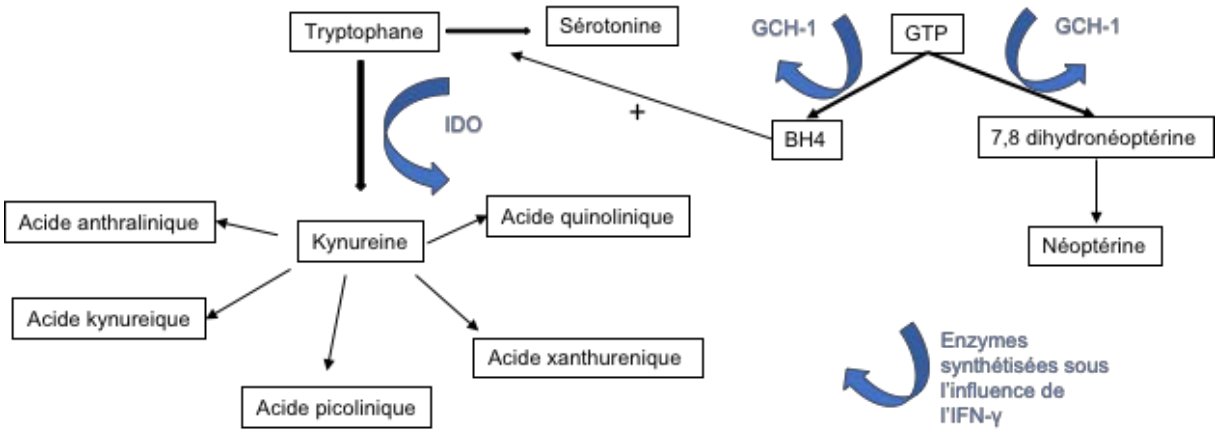


Figure 37 : Schéma de synthèse des voies induites par les enzymes synthétisées par le monocyte sous l'influence de l'IFNγ (IDO et GCH-1). IDO agit sur la voie du tryptophane entrainant sa dégradation et la synthèse de nombreux métabolites. La GCH-1 hydrolyse le GTP entrainant la synthèse soit de BH4 qui active la synthèse de sérotnonine, soit la 7,8 dihydronéoptérine qui aboutit à la formation de la néoptérine. *BH4 : tétrahydrobioptérine ; GCH-1 : guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 ; GTP : guanosine triphosphate ; IDO : indoleamine 2,3- dioxygenase*

Nous avons émis l'hypothèse que l'élévation de la néoptérine chez nos patients devait être corrélée à une diminution des métabolites de la voie du tryptophane, indiquant une activation préférentielle de la voie GTP. Nous avons donc réalisé sur la plateforme de biochimie métabolomique et protéomique de l'hôpital Necker, un dosage plasmatique des métabolites de la voie du tryptophane. La concentration plasmatique de ces métabolites était significativement plus faible chez les patients fracturés comparativement aux contrôles (Figure 38), sans différence entre les patients décédés et survivants.

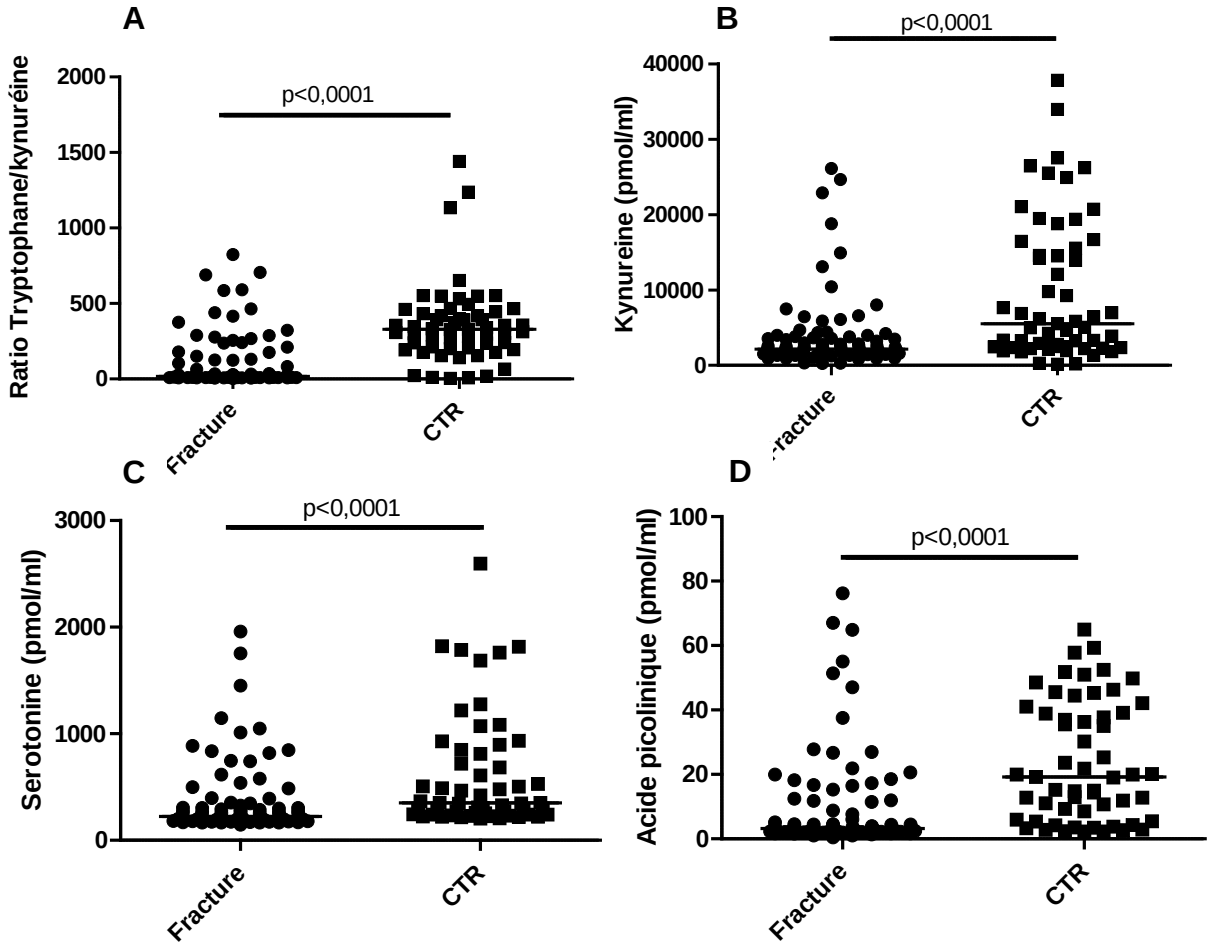


Figure 38 : Taux plasmatiques des métabolites du tryptophane : ratio tryptophane/kynureine (**A**), kynureine (**B**), sérotonine (**C**) et acide picolinique (**D**). Comparaison entre les patients fracturés (n=95) et les contrôles (n=57). La comparaison des groupes est faite par le test de Mann Whitney.

Ces résultats nous permettent de conclure qu'il existe une déviation du métabolisme vers la voie de la néoptérine après une fracture du col fémorale, au dépend de la voie du tryptophane. Ces résultats nous on fait émettre une nouvelle hypothèse qui est celle de la fonctionnalité de la néoptérine. En effet si le métabolisme monocytaire est ainsi dévié après induction par l'IFN-γ, il est possible que ce soit dans un but précis et que la néoptérine ne soit donc pas uniquement un biomarqueur.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps cherché à induire la production de néoptérine par les PBMCs en culture afin de déterminer le meilleur inducteur possible. Nous avons ensuite analysé la capacité de la néoptérine à induire la production de cytokines pro-inflammatoires au sein des monocytes. Nous avons également étudié le rôle de la néoptérine dans la mort cellulaire et dans l'induction de ROS.

1. Induction de néoptérine par les PBMCs

Dans un premier temps, nous avons souhaité vérifier la capacité des PBMCs de sujets jeunes et âgés à produire de la néoptérine avec différents inducteurs dans le but de déterminer la meilleure condition expérimentale.

Quatre inducteurs différents permettaient une production de néoptérine, dans le surnageant de culture, significativement supérieure à la condition non stimulée : le LPS (3nmol/L [1,9-4,4] vs 0,9nmol/L [0,7-1,7] respectivement ; p=0,008), l'IFN-γ (2,3nmol/L [1,2-2,9] vs 0,9nmol/L [0,7-1,7] respectivement ; p=0,001), la concavaline A (2,3nmol/L [1-6,4] vs 0,9nmol/L [0,7-1,7] respectivement ; p=0,04) et l'association IFN-γ+TNF-α (3nmol/L [1,5-6,3] vs 0,9nmol/L [0,7-1,7] respectivement ; p=0,05) (Figure 39A)

L'induction de néoptérine était plus importante chez les contrôles âgés que chez les contrôles jeunes quel que soit l'inducteur. En revanche, ces résultats n'étaient significatifs que pour le LPS et l'IFN-γ (Figure 39B)

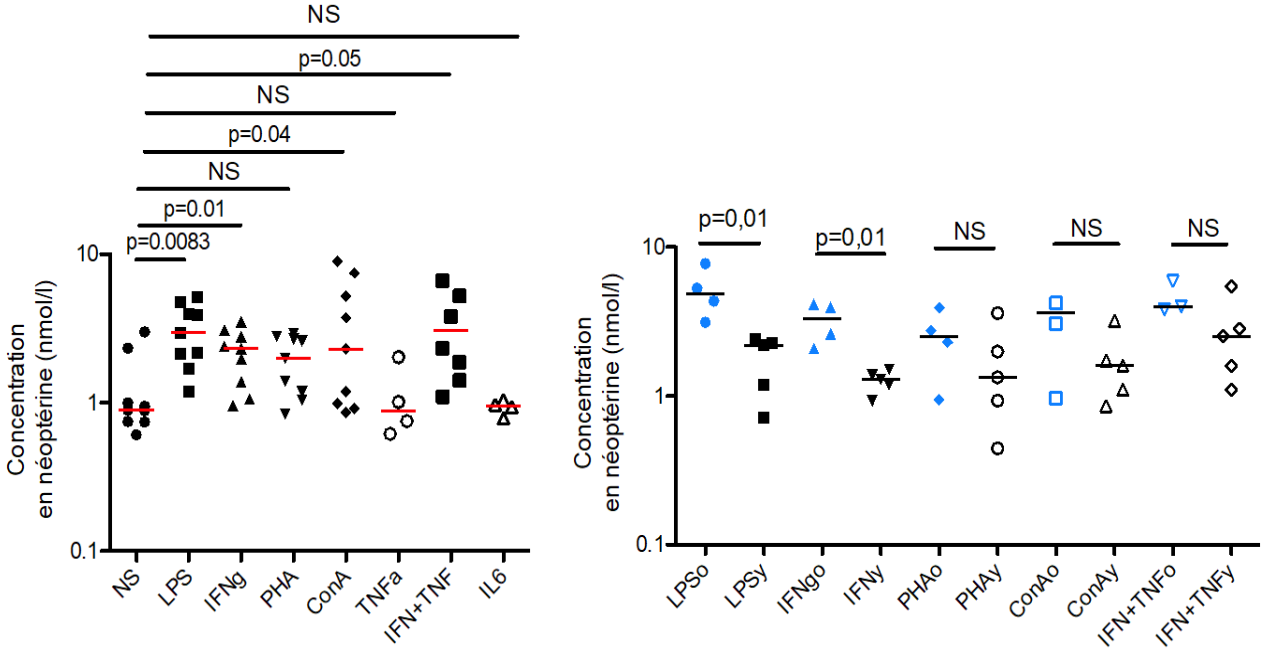


Figure 39: Induction de la production de néoptérine (nmol/l) par les PBMCs en culture après stimulation par différents inducteurs. Évaluation du meilleur inducteur par rapport à la condition non stimulée (NS) (**A**) et comparaison entre les contrôles jeunes et âgés après déduction de NS (**B**). n=9 dont 4 contrôles âgés (en bleu du le graphique) et 5 contrôles jeunes (en noir sur le graphique). Tests statistiques utilisés : t-test apparié (**A**) et Mann Whitney (**B**) . *LPS : lipopolysaccharide, IFNg : interferon γ, PHA : phytohaemagglutinin, ConA : concavaline A, TNFa : Tumor Necrosis Factor α, IL-6: interleukine 6*

Les PBMCs ont donc la capacité de produire de la néoptérine *in vitro*, après stimulation par le LPS, l'IFN-γ, la ConA et l'association IFN-γ+TNF-α. Cette capacité d'induction est majorée chez les patients âgés comparativement aux jeunes.

2. Analyse de la fonctionnalité *in vitro* de la néoptérine

2.1 Induction de la production de cytokines par les PBMCs stimulés par la néoptérine

Des PBMCs de patients contrôles âgés ont été mis en culture pendant 24h et stimulés avec de la néoptérine à 3 doses différentes (100µg, 50µg, 10µg). L'évaluation de la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes a été faite par cytométrie en flux. Ceci avait pour but de vérifier si des phénomènes autocrines permettraient d'amplifier le niveau inflammatoire en réponse à un priming par néoptérine.

On retrouvait une production accrue d'IFN-γ avec 100µg de néoptérine comparativement à la condition non stimulée (2,8% [0,9-6,6] vs 1,9 [0,3-2,9] respectivement ; p=0,016). De plus, on retrouvait une production accrue d'IL-8 avec 50µg de néoptérine comparativement à la condition non stimulée (8% [2,9-14,4] vs 4,6 [1,4-6,6] respectivement ; p=0,03). Enfin, on retrouvait une production accrue d'IL-1β avec 10µg de néoptérine comparativement à la condition non stimulée (5,8% [4-7,6] vs 4,4 [3-5,6] respectivement ; p=0,05) (Figure 40)

Il n'y avait aucune différence dans l'induction de TNF-α quelle que soit la condition. A noter qu'on ne retrouvait pas d'effet dose dans l'induction d'IFN-γ, d'IL-8 et d'IL-1β.

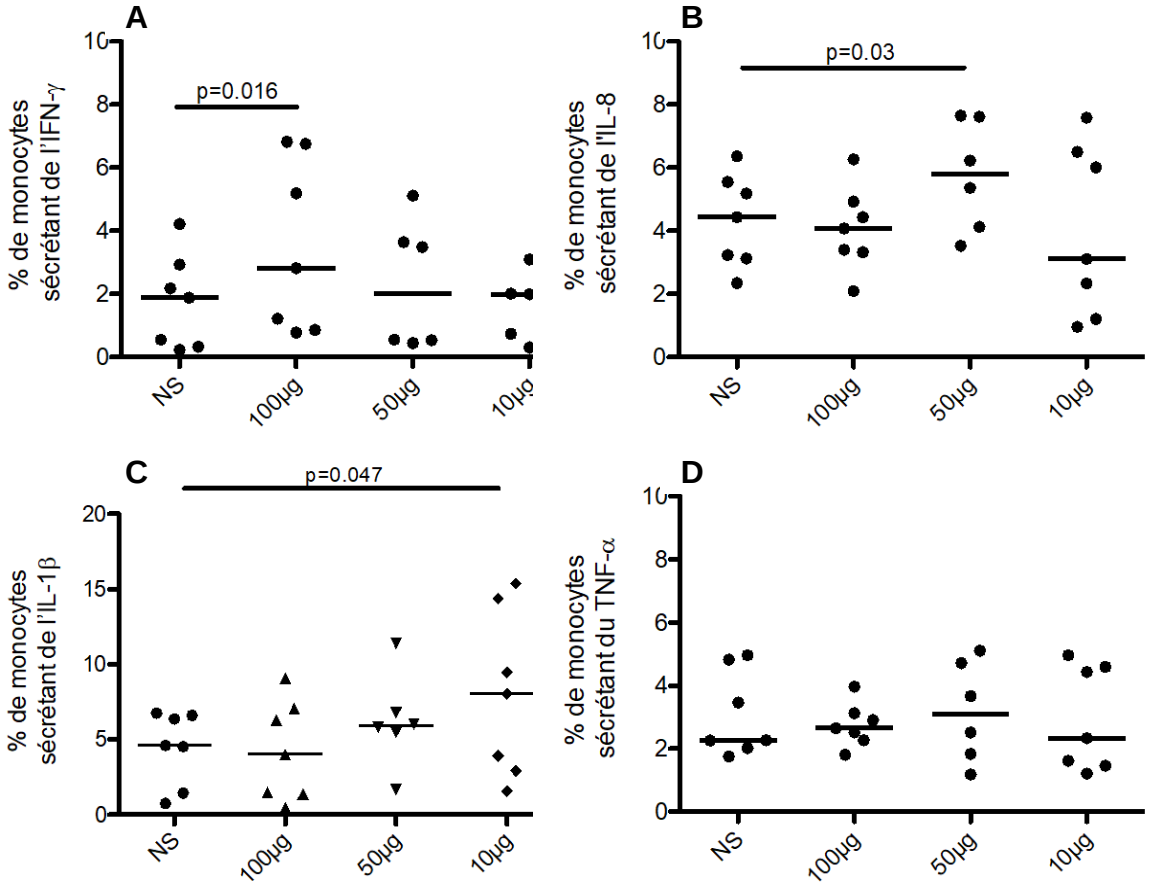


Figure 40 : Production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes en culture après stimulation par différentes doses de néoptérine (100, 50 et 10 µg/ml). Résultats exprimés en % de monocytes sécrétant de l'IFN-γ (**A**), de l'IL-8 (**B**), de l'IL-1β (**C**) et du TNF-α (**D**). n=7. Les médianes sont comparées grâce au test de Mann Whitney. *NS: non stimulé*

Nous avons donc pu induire avec la néoptérine une production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes, ce qui participe probablement à maintenir une hyper-inflammation délétère chez les patients dont le devenir clinique est péjoratif. En revanche nous n'avons pas pu déterminer d'effet dose et les conditions d'induction (dose de néoptérine) étaient différentes pour chaque cytokine.

2.2 Induction de la mort des PBMCs par la néoptérine

Il y a plus de 20 ans, une équipe avait montré la capacité de la néoptérine à induire la mort de cellules musculaires lisses vasculaires chez le rat [250]. Nous avons donc voulu évaluer la capacité de la néoptérine à induire la mort des PBMCs de contrôles âgés. Ces derniers ont été mis en culture 24h, 48h et 72h et stimulés avec 3 doses de néoptérine (100, 50 et 10µg/ml). Les cellules ont ensuite été comptées en bleu de trypan puis marquées à l'Annexin V afin d'évaluer la proportion de cellules mortes en cytométrie de flux. Après 48 et 72h de culture la plupart des cellules étaient mortes lors du comptage en bleu de trypan et le marquage n'a pas pu être réalisé. Nous avons donc gardé uniquement la condition des 24h.

La proportion de cellules CD3+ AnnexinV+ était significativement plus élevée après stimulation par Néoptérine 100µg/ml et 50µg/ml comparativement à la condition non stimulée (8,3% [3,6-9,3] et 7,6% [4,5-7,8] vs 5% [2,6-5,8] respectivement ; p=0,03 et p=0,01 respectivement) (Figure 41A).

La proportion de cellules CD14+ AnnexinV+ était également plus importante après stimulation par néoptérine à 100µg/ml (11,9% [9,4-18,5] vs 4,4% [1,4-7,4] ; p=0,005) et à 50µg/ml (8,8% [8,2-12,9] vs 4,4% [1,4-7,4] ; p=0,01) (Figure 41B).

Dans les deux populations, on observait un effet dose puisque le pourcentage de cellules mortes était maximal sous 100µg/ml de néoptérine puis diminuait progressivement jusqu'à retrouver le niveau de la condition non stimulée sous 10µg/ml (Figure 41)

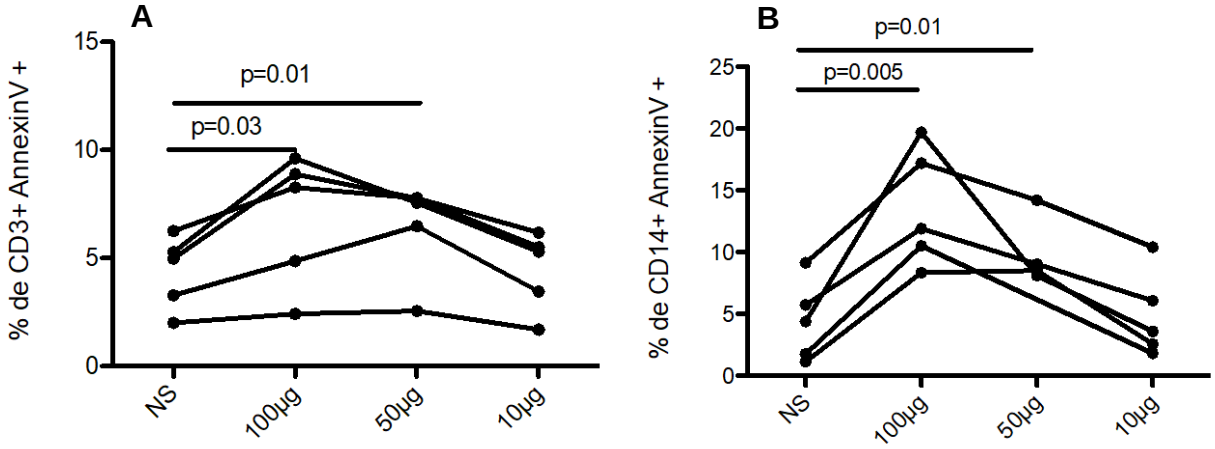


Figure 41 : Induction de la mort cellulaire au sein des LT (A) et des monocytes (B) par différentes doses de néoptérine (100, 50 et 10 µg/ml). Résultats exprimés en % de cellules AnnexinV positives. n=5. La comparaison par rapport à la condition NS est faite par un t-test apparié. *NS: non stimulé*

2.3 Induction de ROS par la néoptérine et mesure de la peroxydation des lipides dans le plasma des patients

Étant donné les liens potentiels entre néoptérine et ROS (notamment l'oxyde nitrique et le radical hydroxyle [206]) dans la littérature, nous avons souhaité évaluer la capacité de la néoptérine à induire des ROS *in vitro*. Nous avons donc stimulé des PBMCs de patient contrôle avec de la néoptérine, sans et avec inhibiteurs de ROS (SOD-PEG et Catalase-PEG) et avons utilisé la PMA et le LPS comme contrôle positif. La mesure des ROS s'effectuait en luminescence après un traitement par Luminol.

La néoptérine induisait bien la production de ROS et cette production était inhibée par les inhibiteurs SOD-PEG et Cat-PEG (Figure 42). L'analyse groupée des 5 contrôles au pic de production de ROS (15min) montrait que la néoptérine induisait significativement plus de ROS que le LPS (RLUs 172 [105-263] vs 70 [45-97] ; p=0,03). De plus, un pré-traitement par SOD-PEG et Catalase-PEG inhibait fortement la

production de ROS (RLUs 30 [18-40] et 23 [7-30] respectivement vs 172 [105-263] ; p=0,008) (Figure 42B)

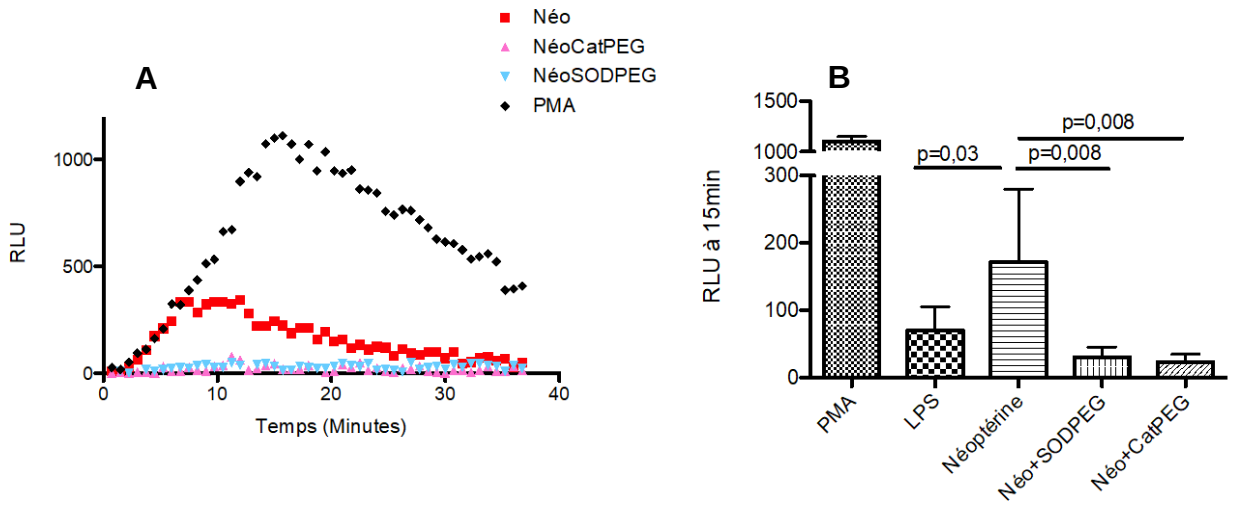


Figure 42 : Production de ROS par les PBMCs induite par la néoptérine. Production de ROS évaluer par la mesure de la luminescence au cours du temps (**A**). La mesure s'effectue toute les 45sec pendant 35min. Comparaison de l'induction de ROS par différents inducteurs et inhibiteurs au maximum de la luminescence (15min) (**B**). Résultats exprimés en luminescence relative (RLU). n=5. Les groupes sont comparés par le test de Mann Whitney. *NS: non stimulé, Néo : néoptérine, LPS : lipopolysaccharide, PMA : phytohaemagglutinin, SODPEG: superoxide dismutase pégylée, CatPEG: catalase pégylée*

Ainsi la néoptérine est bien un inducteur de la production de ROS *in vitro*. Cette induction est même supérieure à celle du LPS dans notre cas.

Nous avons donc souhaité savoir si les patients décédés dans les suites de la fracture, ayant un taux de néoptérine significativement plus élevés que les patients survivants, avaient également des stigmates de stress oxydant plus importants. Nous avons évalué le niveau de stress oxydant dans le plasma des patients de manière indirecte par la mesure de malondialdéhyde (MDA) qui reflète le taux de peroxydation des lipides.

Les résultats montraient un taux significativement plus élevé de MDA dans le plasma des patients décédés comparativement aux survivants (234µmol/L [216-243] vs 201µmol/L [189-225] respectivement ; p=0,005) (Figure 43)

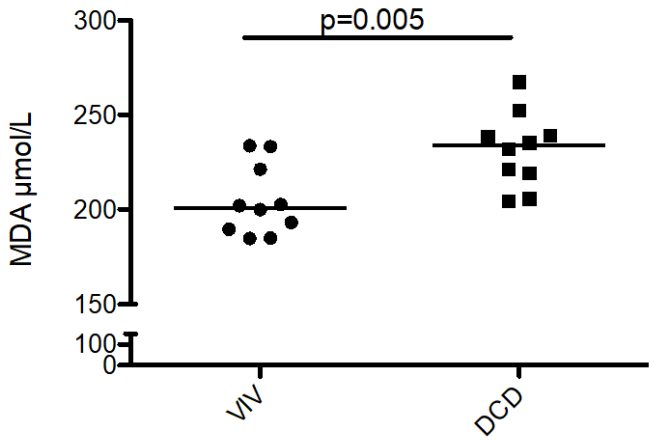


Figure 43 : Evaluation de la peroxydation des lipides dans le plasma des patients par la mesure de la concentration en malondialdéhyde (MDA). Résultats exprimés en µmol/L. n=10. Les groupes sont comparés par le test de Mann Whitney. *DCD: décédé à 6 mois, VIV: vivant à 6 mois.*

Ces résultats sont en faveur d'un stress oxydant plus important chez les patients décédés que les patients survivants.

Conclusion de la partie 3 :

La néoptérine n'est donc pas uniquement un biomarqueur. Son induction est réalisable *in vitro* notamment par le LPS et l'IFN-γ. De plus, elle induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes, la mort des LT et des monocytes ainsi que la production de ROS par les PBMCs *in vitro*. Ainsi la mortalité des patients après une FESF, pourrait être au moins partiellement expliquée par l'action délétère de la néoptérine sur les cellules du système immunitaire.

DISCUSSION

Comme nous l'avons rapporté dans l'introduction, le pronostic de la FESF est lourd, tant en termes de mortalité que de récupération fonctionnelle. Le taux de mortalité est en effet de 25 à 30% 1 an après la FESF. Contrairement à ce que l'on pourrait imaginer, les décès survenant après une FESF sont rarement dus aux complications chirurgicales ou aux complications de l'anesthésie. Ils sont généralement liés à des complications médicales survenant à distance de l'intervention. Ces complications sont de tous types : infections secondaires, décompensation cardiaque ou respiratoire, nouvel épisode de chute … Si l'on replace la FESF sur le schéma de Bouchon (Figure 1), elle constitue un facteur de type 3. Pour la majorité des patients, le traitement de la FESF associé à la rééducation fonctionnelle et à la rééquilibration des pathologies chroniques (facteur 2), suffisent à rééquilibrer leur état de santé et à les remettre à leur état antérieur. Pour un certain nombre d'entre eux malheureusement, la survenue de la FESF a un tel impact sur les réserves fonctionnelles de l'individu que le retour à l'état antérieur est impossible. La FESF constitue alors un facteur d'aggravation de la fragilité du patient et le moindre évènement médical aigu secondaire peut alors rapidement entrainer le patient jusqu'au décès même si cet évènement survient plusieurs mois après l'épisode fracturaire. De nombreuses questions se posent alors : par quel(s) mécanisme(s) la FESF peut-elle impacter les réserves fonctionnelles de l'individu ? Qu'est ce qui peut expliquer les différences de pronostics ?

Ces éléments mettent en lumière que la FESF n'est pas seulement un problème « local » ni uniquement une pathologie d'organe (osseuse) mais qu'elle a bien des conséquences systémiques. Ce sont ces constatations qui nous ont menés à essayer de comprendre l'impact que pouvait avoir la FESF sur le système immunitaire sénescent et les liens potentiels avec le devenir des patients.

La première étape consistait à identifier les patients à risque de mauvais pronostic. Il est en effet extrêmement difficile de les identifier par avance (ou précocement). Bien évidemment, les patients les plus comorbides et les plus fragiles constitue un groupe plus à risque mais cette règle ne s'applique pas toujours, loin de là.

Dans cette démarche, l'utilisation de biomarqueurs pronostiques a alors un intérêt puisqu'il permet par un simple dosage sanguin standardisé de définir une probabilité de décès (ou tout autre paramètre pronostique). En pratique, son interprétation doit bien évidement se faire en prenant en compte le patient dans sa globalité c'est-à-dire en incluant les paramètres comorbidités, polymédication, autonomie fonctionnelle et gravité de la pathologie.

Notre équipe a montré que le taux préopératoire de néoptérine, molécule sécrétée par les monocytes sous l'influence de l'IFN-γ, était hautement prédictif de la mortalité des patients et de leur récupération fonctionnelle. Cette constatation était un premier pas montrant les liens potentiels entre immunité et pronostic de la FESF. L'identification des patients à risque n'a absolument pas pour objectif de déterminer si le patient doit ou non être opéré. La FESF, est en effet une urgence médico-chirurgicale et tous les patients (à de rares exceptions près) doivent être opérés. L'objectif de l'identification des patients à risque est d'améliorer leur prise en charge et de renforcer la surveillance médicale : dépistage précoce des complications, renforcement de la rééducation fonctionnelle, suivi médical rapproché y compris à distance.

La découverte de ce biomarqueur nous a mené à nous poser de nombreuses autres questions. La première était de savoir et de comprendre si la FESF avait un impact plus global sur le système immunitaire et de décrire cet impact tant sur le versant inné qu'adaptatif. Nous souhaitions également savoir si les potentielles modifications immunitaires induites par la FESF étaient les mêmes chez les patients de bon et de

mauvais pronostic. Enfin nous voulions comprendre si la néoptérine n'était qu'un simple biomarqueur d'un phénomène inflammatoire ou si elle avait un effet biologique propre.

La deuxième cohorte de patients nous a permis de confirmer le rôle pronostique de la néoptérine dans la FESF. Contrairement à la 1ère cohorte, les patients décédés à 1 an étaient significativement plus comorbides avec notamment un nombre de patients insuffisant rénal chronique plus élevé que chez les patients survivants. La néoptérine est éliminée par voie rénale, il est donc possible qu'elle soit produite en quantité excessive chez les patients décédés mais également qu'elle soit moins éliminée du fait de l'insuffisance rénale. Parallèlement à ces résultats, les analyses de la NFS étaient en faveur d'une activation de l'immunité innée (hypermonocytose et hyperleucocytose à PNN) et à une suppression de l'immunité adaptative (lymphopénie).

Dans la première partie de mon travail, nous nous sommes attachés à décrire plus précisément les modifications phénotypiques induites par la FESF au cours du temps. Nous avons effectivement pu montrer qu'il existait un phénomène pro-inflammatoire intense au sein du compartiment inné associé à un phénomène anti-inflammatoire au sein du compartiment adaptatif, ces deux phénomènes étant transitoires et constituant une boucle de régulation. Ce phénomène est assez proche de celui décrit dans le sepsis [251]. En effet, depuis plusieurs années, de profonds remaniements immunologiques sont observés au cours du sepsis associant une phase pro-inflammatoire intense appelée « tempête cytokinique » et une phase suppressive. Ainsi, on observe une hyperleucocytose majeure dans les premiers jours tout comme dans notre modèle de FESF. Au cours du sepsis, les PNN acquièrent un profil pro-inflammatoire associant une diminution de l'expression de CD16 et de la L-selectine

avec des capacités anti-apoptotique et une augmentation des capacités de phagocytose et de bactéricidie. Dans notre modèle de FESF nous n'avons pas observé de différences dans l'expression de CD16 et de la L-selectine. L'une des hypothèses pourrait être que le sepsis étant d'origine bactérienne, le compartiment cellulaire le plus précocement et intensément mobilisé est celui des PNN. L'autre hypothèse est que le premier prélèvement est réalisé à l'arrivée du patient aux urgences et donc parfois plusieurs heures après la FESF. Ce délai est peut-être trop tardif pour voir un effet sur les sous populations de PNN. Ce compartiment pourrait être donc comparativement moins mobilisé dans la FESF. De plus, nous n'avons pas réalisé d'étude de la fonctionnalité des PNN. Au cours du sepsis, les modifications phénotypiques subies par les monocytes sont assez proches de ce que nous avons pu observer dans la FESF associant une diminution de l'expression d'HLA-DR, du CD14 et du CX3CR1. Dans notre étude, nous avons observé une diminution de l'expression de CX3CR1 au profit du CCR2 témoignant d'un recrutement intense des monocytes à partir de la moelle osseuse et d'une potentielle migration vers le site fracturaire. Il aurait été intéressant de pouvoir analyser l'infiltrat macrophagique sur le site fracturaire afin de renforcer cette hypothèse. Malheureusement, nous ne disposions pas du matériel biologique suffisant (os, muscle) pour réaliser ces analyses.

De même, tout comme dans notre modèle, une lymphopénie CD4+ et une augmentation de l'expression de PD-1 au sein des LT sont décrits dans le sepsis, témoignant de l'immunosuppression au sein du compartiment adaptatif. Nous n'avons pas observé d'augmentation des LTreg dans notre étude, contrairement à ce qui est décrit dans le sepsis. L'une des explications pourrait être que les patients âgés ont, à l'état basal, un taux de LTreg supérieur aux patients plus jeunes. Ils ont de plus un

taux de LT CD4 naïfs plus bas. Ils pourraient dont être au maximum de leur capacité d'engagement des CD4 naïfs vers la voie des LTreg et ne plus être en capacité de majorer leur production lors d'un évènement aigu.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes attachés à étudier la fonctionnalité et la reprogrammation du monocyte. En effet, l'analyse phénotypique ne nous a pas permis d'apporter suffisamment d'éléments permettant d'expliquer les différences d'évolution des patients. Cependant, étant donné les modifications observées au sein du compartiment monocytaire et le caractère prédictif de la néoptérine, nous avons émis l'hypothèse que le monocyte pouvait être au centre du processus évolutif des patients. Comme expliqué précédemment, la FESF est rarement en elle-même à l'origine du décès des patients. En revanche elle constitue une fragilisation qui fait le lit de complications/décompensations ultérieures. Nous avons donc cherché à comprendre comment réagissaient les monocytes de patients fracturés lorsqu'ils étaient soumis à un deuxième stress que nous avons matérialisé par une stimulation en LPS. Nous avons observé que la fonction des monocytes de patients survivants était tournée vers la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires contrairement aux patients décédés. Les monocytes des patients décédés quant à eux réagissent de manière intense en sécrétant un taux de cytokines pro-inflammatoires important. Ainsi, d'un côté, nous avons des monocytes avec un profil fonctionnel suppressif correspondant à un certain degré de paralysie immunitaire (patients survivants) et de l'autre, des monocytes aux capacités d'activation très élevé (patients décédés). Nous avons, pour cette étape, mesuré le pourcentage de monocytes producteurs de cytokines. Il aurait été intéressant de corréler nos résultats au dosage de ces mêmes

cytokines dans les surnageants de culture afin de renforcer cette hypothèse ou de pratiquer des dosages plasmatiques issus des patients inclus dans l'étude.

Au cours du sepsis, l'équipe de Shalova [228] a montré que les monocytes des patients septiques avaient la capacité de se reprogrammer d'un profil pro- vers un profil anti-inflammatoire. Ces monocytes surexpriment HIF-1a qui entraine l'expression d'IRAKM permettant ainsi l'inhibition de la voie de signalisation des TLR. Cheng [232] quant a lui a montré une augmentation de la glycolyse dépendant de l'activation de la voie Akt/mTOR/HIF-1a au sein des monocytes septiques, associé à une augmentation du stress oxydatif. Enfin, Saeed [252] a montré qu'il existait une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammasome au sein des macrophages en situation de paralysie immunitaire. C'est sur la base de ces 3 travaux que nous avons choisi d'étudier les différences d'expression de gènes impliqués dans la reprogrammation du monocyte. Nous avons montré qu'il existait au sein des PBMCs de patients décédés une surexpression de HIF-1a des différences d'expression de HIF-1a et de gènes impliqués dans l'inflammasome ainsi qu'une sous expression de gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydant. De manière paradoxale, on observait une sous expression du gène codant pour l'hepcidine chez les patients décédés alors qu'il est connu pour être fortement exprimé en situation inflammatoire. De même KLF9, gène impliqué dans le stress oxydant était sous exprimé chez les patients décédés. L'ensemble des résultats obtenus étaient plutôt en faveur de notre hypothèse selon laquelle il existe un défaut de reprogrammation chez les patients décédés. Cependant, il est indispensable d'approfondir cette hypothèse en travaillant sur des monocytes isolés (et non des PBMCs) dans des conditions permettant d'étudier la reprogrammation *in vitro* c'est-à-dire après stimulation en LPS. C'est la

raison pour laquelle l'analyse du transcriptome de ces cellules est en cours de réalisation. Ceci permettra également d'identifier certaines cibles thérapeutiques.

La dernière partie de mon travail consistait à étudier le rôle fonctionnel de la néoptérine. Nous avons pu montrer ses capacités d'induction de cytokines pro-inflammatoires et d'apoptose sur les monocytes et les LT. Le taux de néoptérine étant également corrélé à la reprise de la marche (résultats préliminaires), il serait intéressant de savoir si elle a également une action sur d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires. Nous avons en ce sens quelques résultats préliminaires (non montrés dans la thèse) sur une lignée de myocytes montrant que la néoptérine induit la mort des myocytes et limite leur prolifération. Ces résultats sont d'autant plus encourageants que la lignée est par définition immortalisée et à haut potentiel proliératif. Cependant, afin de nous rapprocher au plus près du modèle de la FESF, nous souhaiterions analyser ces mêmes paramètres sur des myocytes de patients âgés. La néoptérine ayant potentiellement une action toxique sur le muscle, il serait également intéressant de corréler ses taux aux données fonctionnelles que nous possédons sur les patients survivants. L'un des éléments fonctionnels les plus intéressant, outre la reprise de la marche, que nous possédons sur la deuxième cohorte est le « Short Physical Performance Baterry » (SPPB). Il s'agit d'un score de performance physique alliant un test d'équilibre, de vitesse de marche et de lever de chaise. Ce score s'il est inférieur à 8 est un indicateur de sarcopénie [253].

Nous avons également montré que la néoptérine était pourvoyeuse de production de ROS par les PBMCs. Il serait maintenant intéressant de déterminer le type de ROS produit de même que leurs voies de production (NADPH oxydase et/ou mitochondrie) en bloquant la chaine respiratoire mitochondriale. Dans notre travail, la production de

ROS induite par la néoptérine est inhibée aussi bien par la catalase que par la superoxyde dismutase. La catalase catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau alors que la superoxyde dismutase catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il est donc probable que les ROS induits par la néoptérine soit, au moins en partie issus de l'anion superoxyde.

Le rôle de la néoptérine sur la reprogrammation monocytaire est totalement inconnu. Si l'analyse du transcriptome des monocytes triés stimulés en LPS montre des différences d'expression de gènes entre les patients décédés et survivants, il serait intéressant d'analyser l'expression de ces mêmes gènes sur des monocytes triés de contrôles sains préalablement exposés à la néoptérine.

Après avoir exploré l'effet de la néoptérine *in vitro*, il serait également intéressant de l'étudier *in vivo* notamment sur modèle murin. L'objectif pourrait être d'évaluer l'effet de l'injection de doses croissantes de néoptérine chez des souris jeunes et âgées comparativement aux contrôles. Il serait alors intéressant de comparer leur mortalité mais surtout leurs capacités physiques et l'éventuelle induction d'une fonte musculaire ou sarcopénie. Il pourrait également être intéressant d'étudier les mêmes éléments sur des souris KO pour le gène HIF-1α afin de comprendre si l'activation de la reprogrammation du monocyte est bénéfique *in vivo* en cas d'exposition à la néoptérine.

L'objectif à long terme d'une meilleure compréhension de l'action de la néoptérine est d'évaluer l'intérêt de son inhibition sur le pronostic des patients ayant une FESF. Dans la littérature, plusieurs molécules ont montré leur capacité à inhiber la production de néoptérine. Ainsi le tacrolimus, la prednisone, le mycophénolate mofétil, la cyclosportine A et la rapamycine réduisent significativement la production de néoptérine par les PBMCs humains stimulés *in vitro* grâce à un mécanisme d'inhibition

d'IDO [254]. Cependant toutes ces molécules ont un potentiel immunosuppresseur fort et sont pourvoyeuses de nombreux effets secondaires rendant leur utilisation chez le patient âgé quasiment inenvisageable dans le contexte d'une FESF. L'idéal serait donc de tester *in vitro* des molécules connues pour être relativement bien tolérées dans la population âgée. La N acétyl cystéine (NAC), inducteur de glutathion antioxydant, limite les effets délétères de la néoptérine sur la contractibilité cardiaque des rats [255]. De plus, elle induit une diminution du taux de néoptérine dans le sérum de rats ayant une nécrose tubulaire aigue (insuffisance rénale aigue) [256]. La mélatonine, utilisée fréquemment en gériatrie pour les troubles du sommeil, a une action antioxydante et anti-inflammatoire connue [257, 258] mais son effet sur la néoptérine n'est pas connue. De manière plus anecdotique, le sulforafane composé anti-oxydant présent à l'état naturel dans le brocoli, entraine également une diminution du taux de néoptérine dans un modèle d'hépatite aigue chez le rat [259]. Toutes ces molécules sont des pistes potentielles pour l'inhibition de la production et de la fonction de la néoptérine *in vitro* qu'il reste à explorer.

Tout au long de ce travail, j'ai pu mettre en évidence qu'il existait des similitudes dans les phénomènes immunologiques induits par la fracture et le sepsis. Tout porte à croire que le mécanisme global est assez proche ce qui suggère que le rôle du système neuro-endocrino-immunitaire est important. Quel que soit l'évènement déclencheur il est possible qu'il soit perçu par le système nerveux central comme un même stress contre lequel il induit une réponse immunitaire adaptée. Il serait alors intéressant d'étudier les phénomènes immunologiques dans d'autres modèles de stress aigu comme l'insuffisance cardiaque, pulmonaire ou rénale aigue.

REFERENCES

1. Bouchon JP. 1+2+3 ou comment tenter d'être efficace en gériatrie? Rev Prat 1984:34:888-892.

2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L et al. The hallmarks of aging. Cell 2013; 153(6):1194–1217.

3. El Assar M, Angulo J, Carnicero JA et al. Frailty Is Associated With Lower Expression of Genes Involved in Cellular Response to Stress: Results From the Toledo Study for Healthy Aging. J. Am. Med. Dir. Assoc. 2017; 18(8):734.e1-734.e7.

4. Population Division Department of Economic and Social Affairs. World Population Ageing: 1950-2050. 2001.

5. Insee - Population - Population par âge. [http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?reg_id=0&ref_id=T16F032#inter2].

6. Fielding RA, Vellas B, Evans WJ et al. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. J. Am. Med. Dir. Assoc. 2011; 12(4):249–256.

7. Lexell J, Henriksson-Larsén K, Winblad B, Sjöström M. Distribution of different fiber types in human skeletal muscles: effects of aging studied in whole muscle cross sections. Muscle Nerve 1983; 6(8):588–595.

8. Larsson L. Histochemical characteristics of human skeletal muscle during aging. Acta Physiol. Scand. 1983; 117(3):469–471.

9. Wilson D, Jackson T, Sapey E, Lord JM. Frailty and sarcopenia: The potential role of an aged immune system. Ageing Res. Rev. 2017; 36:1–10.

10. Vitale G, Cesari M, Mari D. Aging of the endocrine system and its potential impact on sarcopenia. Eur. J. Intern. Med. 2016; 35:10–15.

11. Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 2000; 89(1):81–88.

12. Cesari M, Fielding RA, Pahor M et al. Biomarkers of sarcopenia in clinical trials-recommendations from the International Working Group on Sarcopenia. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 2012; 3(3):181–190.

13. Rolland Y, Czerwinski S, Abellan Van Kan G et al. Sarcopenia: its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives. J. Nutr. Health Aging 2008; 12(7):433–450.

14. Kelley GA, Kelley KS. Is sarcopenia associated with an increased risk of all-cause mortality and functional disability? Exp. Gerontol. 2017; 96:100–103.

15. Lakatta EG. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? J. Mol. Cell. Cardiol. 2015; 83:1–13.

16. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. Cardiovasc. Res. 2005; 66(2):286–294.

17. Lloyd-Jones DM, Evans JC, Levy D. Hypertension in adults across the age spectrum: current outcomes and control in the community. JAMA 2005; 294(4):466–472.

18. Obas V, Vasan RS. The aging heart. Clin. Sci. Lond. Engl. 1979 2018; 132(13):1367–1382.

19. Skloot GS. The Effects of Aging on Lung Structure and Function. Clin. Geriatr. Med. 2017; 33(4):447–457.

20. Brandenberger C, Mühlfeld C. Mechanisms of lung aging. Cell Tissue Res. 2017; 367(3):469–480.

21. Lowery EM, Brubaker AL, Kuhlmann E, Kovacs EJ. The aging lung. Clin. Interv. Aging 2013; 8:1489–1496.

22. Brown EN, Purdon PL. The aging brain and anesthesia. Curr. Opin. Anaesthesiol. 2013; 26(4):414–419.

23. Calso C, Besnard J, Allain P. [Normal aging of frontal lobe functions]. Geriatr. Psychol. Neuropsychiatr. Vieil. 2016; 14(1):77–85.

24. Barnett K, Mercer SW, Norbury M et al. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. Lancet Lond. Engl. 2012; 380(9836):37–43.

25. Salive ME. Multimorbidity in older adults. Epidemiol. Rev. 2013; 35:75–83.

26. Wolff JL, Starfield B, Anderson G. Prevalence, expenditures, and complications of multiple chronic conditions in the elderly. Arch. Intern. Med. 2002; 162(20):2269–2276.

27. Menotti A, Mulder I, Nissinen A et al. Prevalence of morbidity and multimorbidity in elderly male populations and their impact on 10-year all-cause mortality: The FINE study (Finland, Italy, Netherlands, Elderly). J. Clin. Epidemiol. 2001; 54(7):680–686.

28. Linn BS, Linn MW, Gurel L. Cumulative illness rating scale. J. Am. Geriatr. Soc. 1968; 16(5):622–626.

29. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J. Chronic Dis. 1987; 40(5):373–383.

30. Miller MD, Paradis CF, Houck PR et al. Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research: application of the Cumulative Illness Rating Scale. Psychiatry Res. 1992; 41(3):237–248.

31. Abd Aziz NAS, Teng NIMF, Abdul Hamid MR, Ismail NH. Assessing the nutritional status of hospitalized elderly. Clin. Interv. Aging 2017; 12:1615–1625.

32. Neumann SA, Miller MD, Daniels L, Crotty M. Nutritional status and clinical outcomes of older patients in rehabilitation. J. Hum. Nutr. Diet. Off. J. Br. Diet. Assoc. 2005; 18(2):129–136.

33. Walston J, Hadley EC, Ferrucci L et al. Research agenda for frailty in older adults: toward a better understanding of physiology and etiology: summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults. J. Am. Geriatr. Soc. 2006; 54(6):991–1001.

34. Ferri CP, Prince M, Brayne C et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet Lond. Engl. 2005; 366(9503):2112–2117.

35. American Psychiatric Association. Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington 2013. doi:10.1176/appi.books.9780890425596.

36. Hugo J, Ganguli M. Dementia and Cognitive Impairment: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. Clin. Geriatr. Med. 2014; 30(3):421–442.

37. Introduction / Maladies cardio-neuro-vasculaires / Maladies chroniques et traumatismes / Dossiers thématiques / Accueil. [http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Maladies-cardio-neuro-vasculaires/Introduction].

38. Yazdanyar A, Newman AB. The burden of cardiovascular disease in the elderly: morbidity, mortality, and costs. Clin. Geriatr. Med. 2009; 25(4):563–577, vii.

39. Briot K, Roux C, Thomas T et al. 2018 update of French recommendations on the management of postmenopausal osteoporosis. Jt. Bone Spine Rev. Rhum. 2018; 85(5):519–530.

40. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. Lancet Lond. Engl. 2002; 359(9319):1761–1767.

41. Katz S, Akpom CA. 12. Index of ADL. Med. Care 1976; 14(5 Suppl):116–118.

42. Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. The Gerontologist 1969; 9(3):179–186.

43. Barberger-Gateau P, Commenges D, Gagnon M et al. Instrumental activities of daily living as a screening tool for cognitive impairment and dementia in elderly community dwellers. J. Am. Geriatr. Soc. 1992; 40(11):1129–1134.

44. Clegg A, Young J, Iliffe S et al. Frailty in elderly people. Lancet Lond. Engl. 2013; 381(9868):752–762.

45. Cruz-Jentoft AJ, Kiesswetter E, Drey M, Sieber CC. Nutrition, frailty, and sarcopenia. Aging Clin. Exp. Res. 2017; 29(1):43–48.

46. Rockwood K, Song X, MacKnight C et al. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can. 2005; 173(5):489–495.

47. http://geriatricresearch.medicine.dal.ca/clinical_frailty_scale.htm. .

48. Fried LP, Ferrucci L, Darer J et al. Untangling the concepts of disability, frailty, and comorbidity: implications for improved targeting and care. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2004; 59(3):255–263.

49. Faye C, Mcgowan JC, Denny CA, David DJ. Neurobiological Mechanisms of Stress Resilience and Implications for the Aged Population. Curr. Neuropharmacol. 2018; 16(3):234–270.

50. Goronzy JJ, Weyand CM. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. Nat. Immunol. 2013; 14(5):428–436.

51. Vallet H, Fali T, Sauce D. [Aging of the immune system: From fundamental to clinical data]. Rev. Med. Interne 2019; 40(2):105–111.

52. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood 2010; 116(16):e74-80.

53. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity 2003; 19(1):71–82.

54. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. Nat. Immunol. 2006; 7(3):311–317.

55. Ancuta P, Rao R, Moses A et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. J. Exp. Med. 2003; 197(12):1701–1707.

56. Ancuta P, Liu K-Y, Misra V et al. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. BMC Genomics 2009; 10:403.

57. Cros J, Cagnard N, Woollard K et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. Immunity 2010; 33(3):375–386.

58. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. J. Immunol. Baltim. Md 1950 2002; 168(7):3536–3542.

59. Nyugen J, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S. Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. J. Clin. Immunol. 2010; 30(6):806–813.

60. Hearps AC, Martin GE, Angelovich TA et al. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. Aging Cell 2012; 11(5):867–875.

61. De Martinis M, Modesti M, Ginaldi L. Phenotypic and functional changes of circulating monocytes and polymorphonuclear leucocytes from elderly persons. Immunol. Cell Biol. 2004; 82(4):415–420.

62. Jackaman C, Tomay F, Duong L et al. Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils. Ageing Res. Rev. 2017; 36:105–116.

63. Mantovani A, Sica A, Sozzani S et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 2004; 25(12):677–686.

64. Aprahamian T, Takemura Y, Goukassian D, Walsh K. Ageing is associated with diminished apoptotic cell clearance in vivo. Clin. Exp. Immunol. 2008; 152(3):448–455.

65. Linehan E, Dombrowski Y, Snoddy R et al. Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. Aging Cell 2014; 13(4):699–708.

66. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. J. Invest. Dermatol. 2001; 117(5):1027–1035.

67. Mancuso P, McNish RW, Peters-Golden M, Brock TG. Evaluation of phagocytosis and arachidonate metabolism by alveolar macrophages and recruited neutrophils from F344xBN rats of different ages. Mech. Ageing Dev. 2001; 122(15):1899–1913.

68. Hilmer SN, Cogger VC, Le Couteur DG. Basal activity of Kupffer cells increases with old age. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2007; 62(9):973–978.

69. Boehmer ED, Goral J, Faunce DE, Kovacs EJ. Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. J. Leukoc. Biol. 2004; 75(2):342–349.

70. Mahbub S, Deburghgraeve CR, Kovacs EJ. Advanced age impairs macrophage polarization. J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res. 2012; 32(1):18–26.

71. Tasat DR, Mancuso R, O'Connor S, Molinari B. Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages. Aging Cell 2003; 2(3):159–164.

72. Smallwood HS, López-Ferrer D, Squier TC. Aging enhances the production of reactive oxygen species and bactericidal activity in peritoneal macrophages by upregulating classical activation pathways. Biochemistry 2011; 50(45):9911–9922.

73. Fortin CF, McDonald PP, Lesur O, Fülöp T. Aging and neutrophils: there is still much to do. Rejuvenation Res. 2008; 11(5):873–882.

74. Angelis P, Scharf S, Christophidis N. Effects of age on neutrophil function and its relevance to bacterial infections in the elderly. J. Clin. Lab. Immunol. 1997; 49(1):33–40.

75. Corberand J, Ngyen F, Laharrague P et al. Polymorphonuclear functions and aging in humans. J. Am. Geriatr. Soc. 1981; 29(9):391–397.

76. Sauce D, Dong Y, Campillo-Gimenez L et al. Reduced Oxidative Burst by Primed Neutrophils in the Elderly Individuals Is Associated With Increased Levels of the CD16bright/CD62Ldim Immunosuppressive Subset. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2017; 72(2):163–172.

77. Martin C, Burdon PCE, Bridger G et al. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. Immunity 2003; 19(4):583–593.

78. Butcher SK, Chahal H, Nayak L et al. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. J. Leukoc. Biol. 2001; 70(6):881–886.

79. Fulop T, Larbi A, Douziech N et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. Aging Cell 2004; 3(4):217–226.

80. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S et al. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. J. Clin. Invest. 2009; 119(10):3070–3078.

81. Zlamy M, Almanzar G, Parson W et al. Efforts of the human immune system to maintain the peripheral CD8+ T cell compartment after childhood thymectomy. Immun. Ageing A 2016; 13:3.

82. Naylor K, Li G, Vallejo AN et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 2005; 174(11):7446–7452.

83. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. J. Immunol. Baltim. Md 1950 2014; 192(6):2689–2698.

84. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F et al. The immune system in extreme longevity. Exp. Gerontol. 2008; 43(2):61–65.

85. Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. Mech. Ageing Dev. 2000; 121(1–3):77–88.

86. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. Nat. Rev. Immunol. 2008; 8(7):512–522.

87. Fann M, Chiu WK, Wood WH et al. Gene expression characteristics of CD28null memory phenotype CD8+ T cells and its implication in T-cell aging. Immunol. Rev. 2005; 205:190–206.

88. Lages CS, Suffia I, Velilla PA et al. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 2008; 181(3):1835–1848.

89. Gregg R, Smith CM, Clark FJ et al. The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. Clin. Exp. Immunol. 2005; 140(3):540–546.

90. Frasca D, Diaz A, Romero M, Blomberg BB. Human peripheral late/exhausted memory B cells express a senescent-associated secretory phenotype and preferentially utilize metabolic signaling pathways. Exp. Gerontol. 2017; 87(Pt A):113–120.

91. Johnson SA, Cambier JC. Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. Arthritis Res. Ther. 2004; 6(4):131–139.

92. Naradikian MS, Hao Y, Cancro MP. Age-associated B cells: key mediators of both protective and autoreactive humoral responses. Immunol. Rev. 2016; 269(1):118–129.

93. Loke P, Allison JP. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. Arthritis Res. Ther. 2004; 6(5):208–214.

94. Linsley PS, Golstein P. Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. Curr. Biol. CB 1996; 6(4):398–400.

95. Canaday DH, Parker KE, Aung H et al. Age-dependent changes in the expression of regulatory cell surface ligands in activated human T-cells. BMC Immunol. 2013; 14:45.

96. Dolfi DV, Mansfield KD, Polley AM et al. Increased T-bet is associated with senescence of influenza virus-specific CD8 T cells in aged humans. J. Leukoc. Biol. 2013; 93(6):825–836.

97. Vukmanovic-Stejic M, Sandhu D, Seidel JA et al. The Characterization of Varicella Zoster Virus-Specific T Cells in Skin and Blood during Aging. J. Invest. Dermatol. 2015; 135(7):1752–1762.

98. Fernández Do Porto DA, Jurado JO, Pasquinelli V et al. CD137 differentially regulates innate and adaptive immunity against Mycobacterium tuberculosis. Immunol. Cell Biol. 2012; 90(4):449–456.

99. Zasada M, Lenart M, Rutkowska-Zapała M et al. Analysis of PD-1 expression in the monocyte subsets from non-septic and septic preterm neonates. PloS One 2017; 12(10):e0186819.

100. Hudig D, Hunter KW, Diamond WJ, Redelman D. Properties of human blood monocytes. II. Monocytes from healthy adults are highly heterogeneous within and among individuals. Cytometry B Clin. Cytom. 2014; 86(2):121–134.

101. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. Nat. Med. 2010; 16(4):452–459.

102. Pang WW, Price EA, Sahoo D et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011; 108(50):20012–20017.

103. Geiger H, de Haan G, Florian MC. The ageing haematopoietic stem cell compartment. Nat. Rev. Immunol. 2013; 13(5):376–389.

104. Lee J, Yoon SR, Choi I, Jung H. Causes and Mechanisms of Hematopoietic Stem Cell Aging. Int. J. Mol. Sci. 2019. doi:10.3390/ijms20061272.

105. Fali T, Fabre-Mersseman V, Yamamoto T et al. Elderly human hematopoietic progenitor cells express cellular senescence markers and are more susceptible to pyroptosis. JCI Insight 2018. doi:10.1172/jci.insight.95319.

106. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2014; 69 Suppl 1:S4-9.

107. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E et al. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. Eur. J. Immunol. 1993; 23(9):2375–2378.

108. Franceschi C, Capri M, Monti D et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. Mech. Ageing Dev. 2007; 128(1):92–105.

109. Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R et al. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. J. Proteomics 2011; 74(11):2313–2323.

110. Olivieri F, Albertini MC, Orciani M et al. DNA damage response (DDR) and senescence: shuttled inflamma-miRNAs on the stage of inflamm-aging. Oncotarget 2015; 6(34):35509–35521.

111. Jones DL, Rando TA. Emerging models and paradigms for stem cell ageing. Nat. Cell Biol. 2011; 13(5):506–512.

112. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. Aging 2012; 4(3):166–175.

113. Xia S, Zhang X, Zheng S et al. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. J. Immunol. Res. 2016; 2016:8426874.

114. Fülöp T, Dupuis G, Witkowski JM, Larbi A. The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. Rev. Investig. Clin. Organo Hosp. Enfermedades Nutr. 2016; 68(2):84–91.

115. Van Den Biggelaar AHJ, De Craen AJM, Gussekloo J et al. Inflammation underlying cardiovascular mortality is a late consequence of evolutionary programming. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 2004; 18(9):1022–1024.

116. Salvioli S, Capri M, Bucci L et al. Why do centenarians escape or postpone cancer? The role of IGF-1, inflammation and p53. Cancer Immunol. Immunother. CII 2009; 58(12):1909–1917.

117. Carrieri G, Marzi E, Olivieri F et al. The G/C915 polymorphism of transforming growth factor beta1 is associated with human longevity: a study in Italian centenarians. Aging Cell 2004; 3(6):443–448.

118. Ferguson FG, Wikby A, Maxson P et al. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 1995; 50(6):B378-382.

119. Pawelec G, Ferguson FG, Wikby A. The SENIEUR protocol after 16 years. Mech. Ageing Dev. 2001; 122(2):132–134.

120. Olsson J, Wikby A, Johansson B et al. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. Mech. Ageing Dev. 2000; 121(1–3):187–201.

121. Hadrup SR, Strindhall J, Køllgaard T et al. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. J. Immunol. Baltim. Md 1950 2006; 176(4):2645–2653.

122. Strindhall J, Nilsson B-O, Löfgren S et al. No Immune Risk Profile among individuals who reach 100 years of age: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study. Exp. Gerontol. 2007; 42(8):753–761.

123. Formiga F, Ferrer A, Padros G et al. Inverted CD4:CD8 ratio is not associated with three-year mortality in a sample of community-dwelling oldest old: the OCTABAIX immune study. J. Nutr. Health Aging 2014; 18(4):425–428.

124. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. Crit. Care Med. 2006; 34(1):15–21.

125. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016; 315(8):762–774.

126. Martin-Loeches I, Guia MC, Vallecoccia MS et al. Risk factors for mortality in elderly and very elderly critically ill patients with sepsis: a prospective, observational, multicenter cohort study. Ann. Intensive Care 2019; 9(1):26.

127. Meyer KC. The role of immunity and inflammation in lung senescence and susceptibility to infection in the elderly. Semin. Respir. Crit. Care Med. 2010; 31(5):561–574.

128. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. Lancet Lond. Engl. 2018; 391(10127):1285–1300.

129. Levin MJ. Immune senescence and vaccines to prevent herpes zoster in older persons. Curr. Opin. Immunol. 2012; 24(4):494–500.

130. Gershon AA, Gershon MD, Breuer J et al. Advances in the understanding of the pathogenesis and epidemiology of herpes zoster. J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 2010; 48 Suppl 1:S2-7.

131. Goodwin K, Viboud C, Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. Vaccine 2006; 24(8):1159–1169.

132. Derhovanessian E, Pawelec G. Vaccination in the elderly. Microb. Biotechnol. 2012; 5(2):226–232.

133. Whitaker JA, von Itzstein MS, Poland GA. Strategies to maximize influenza vaccine impact in older adults. Vaccine 2018; 36(40):5940–5948.

134. Weinberger B. Adjuvant strategies to improve vaccination of the elderly population. Curr. Opin. Pharmacol. 2018; 41:34–41.

135. Lal H, Cunningham AL, Godeaux O et al. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults. N. Engl. J. Med. 2015; 372(22):2087–2096.

136. INCA - Les cancers en France. [http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/].

137. Gaultier De Saint Basile H, Poisson C, Arrondeau J et al. [Efficacy and toxicity of immune checkpoint inhibitors in elderly patients - 5th edition of the congress of pharmacology of anticancer drugs]. Bull. Cancer (Paris) 2018; 105(12):1202–1208.

138. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 2015; 33(17):1974–1982.

139. Nishijima TF, Muss HB, Shachar SS, Moschos SJ. Comparison of efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICIs) between younger and older patients: A systematic review and meta-analysis. Cancer Treat. Rev. 2016; 45:30–37.

140. Wu Q, Wang Q, Tang X et al. Correlation between patients' age and cancer immunotherapy efficacy. Oncoimmunology 2019; 8(4):e1568810.

141. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB et al. Alzheimer's disease. Lancet Lond. Engl. 2016; 388(10043):505–517.

142. Costantini E, D'Angelo C, Reale M. The Role of Immunosenescence in Neurodegenerative Diseases. Mediators Inflamm. 2018; 2018:6039171.

143. Suh Y, Atzmon G, Cho M-O et al. Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008; 105(9):3438–3442.

144. Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R et al. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009; 106(8):2700–2705.

145. Li Y, Qin J, Wei X et al. Association of SIRT6 Gene Polymorphisms with Human Longevity. Iran. J. Public Health 2016; 45(11):1420–1426.

146. Dewey FE, Murray MF, Overton JD et al. Distribution and clinical impact of functional variants in 50,726 whole-exome sequences from the DiscovEHR study. Science 2016. doi:10.1126/science.aaf6814.

147. Bucci L, Ostan R, Giampieri E et al. Immune parameters identify Italian centenarians with a longer five-year survival independent of their health and functional status. Exp. Gerontol. 2014; 54:14–20.

148. Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. Immunol. Today 1995; 16(1):12–16.

149. Chung KW, Kim DH, Park MH et al. Recent advances in calorie restriction research on aging. Exp. Gerontol. 2013; 48(10):1049–1053.

150. Belsky DW, Huffman KM, Pieper CF et al. Change in the Rate of Biological Aging in Response to Caloric Restriction: CALERIE Biobank Analysis. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2017; 73(1):4–10.

151. Harris D, Haboubi N. Malnutrition screening in the elderly population. J. R. Soc. Med. 2005; 98(9):411–414.

152. Fried LP, Tangen CM, Walston J et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2001; 56(3):M146-156.

153. Longo VD, Antebi A, Bartke A et al. Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready? Aging Cell 2015; 14(4):497–510.

154. Mannick JB, Del Giudice G, Lattanzi M et al. mTOR inhibition improves immune function in the elderly. Sci. Transl. Med. 2014; 6(268):268ra179.

155. Kraig E, Linehan LA, Liang H et al. A randomized control trial to establish the feasibility and safety of rapamycin treatment in an older human cohort: Immunological, physical performance, and cognitive effects. Exp. Gerontol. 2018; 105:53–69.

156. Soefje SA, Karnad A, Brenner AJ. Common toxicities of mammalian target of rapamycin inhibitors. Target. Oncol. 2011; 6(2):125–129.

157. Abbasi F, Chu JW, McLaughlin T et al. Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. Metabolism. 2004; 53(2):159–164.

158. Anisimov VN. Metformin for aging and cancer prevention. Aging 2010; 2(11):760–774.

159. Ng TP, Feng L, Yap KB et al. Long-term metformin usage and cognitive function among older adults with diabetes. J. Alzheimers Dis. JAD 2014; 41(1):61–68.

160. Maes M, Lin A, Kenis G et al. The effects of noradrenaline and alpha-2 adrenoceptor agents on the production of monocytic products. Psychiatry Res. 2000; 96(3):245–253.

161. Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Porter K et al. Depressive symptoms, omega-6:omega-3 fatty acids, and inflammation in older adults. Psychosom. Med. 2007; 69(3):217–224.

162. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. Nat. Rev. Immunol. 2005; 5(3):243–251.

163. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. Trends Immunol. 2003; 24(8):444–448.

164. Kasahara E, Inoue M. Cross-talk between HPA-axis-increased glucocorticoids and mitochondrial stress determines immune responses and clinical manifestations of patients with sepsis. Redox Rep. Commun. Free Radic. Res. 2015; 20(1):1–10.

165. Molina V, Asselineau A. PROBLÉMATIQUE DES FRACTURES DE L'EXTRÉMITÉ SUPÉRIEURE DU FÉMUR. .

166. Haentjens P, Magaziner J, Colón-Emeric CS et al. Meta-analysis: excess mortality after hip fracture among older women and men. Ann. Intern. Med. 2010; 152(6):380–390.

167. Briot K, Maravic M, Roux C. Changes in number and incidence of hip fractures over 12 years in France. Bone 2015; 81:131–137.

168. Frost SA, Nguyen ND, Black DA et al. Risk factors for in-hospital post-hip fracture mortality. Bone 2011; 49(3):553–558.

169. Les modalités de prise en charge des fractures du col du fémur en France de 1998 à 2009 - er774.pdf. [http://www.epsilon.insee.fr/jspui/bitstream/1/12499/1/er774.pdf].

170. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. BMJ 1996; 312(7041):1254–1259.

171. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA 1994; 4(6):368–381.

172. Cummings SR, Nevitt MC. Non-skeletal determinants of fractures: the potential importance of the mechanics of falls. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA 1994; 4 Suppl 1:67–70.

173. Magaziner J, Hawkes W, Hebel JR et al. Recovery from hip fracture in eight areas of function. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2000; 55(9):M498-507.

174. Morri M, Chiari P, Forni C et al. What factors are associated with the recovery of autonomy after a hip fracture? A prospective multicentric cohort study. Arch. Phys. Med. Rehabil. 2018. doi:10.1016/j.apmr.2018.01.021.

175. Borgström F, Lekander I, Ivergård M et al. The International Costs and Utilities Related to Osteoporotic Fractures Study (ICUROS)--quality of life during the first 4 months after fracture. Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA 2013; 24(3):811–823.

176. Ekström W, Németh G, Samnegård E et al. Quality of life after a subtrochanteric fracture: a prospective cohort study on 87 elderly patients. Injury 2009; 40(4):371–376.

177. Alexiou KI, Roushias A, Varitimidis SE, Malizos KN. Quality of life and psychological consequences in elderly patients after a hip fracture: a review. Clin. Interv. Aging 2018; 13:143–150.

178. Svedbom A, Borgstöm F, Hernlund E et al. Quality of life for up to 18 months after low-energy hip, vertebral, and distal forearm fractures-results from the ICUROS. Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA 2017. doi:10.1007/s00198-017-4317-4.

179. Nettleman MD, Alsip J, Schrader M, Schulte M. Predictors of mortality after acute hip fracture. J. Gen. Intern. Med. 1996; 11(12):765–767.

180. Roche JJW, Wenn RT, Sahota O, Moran CG. Effect of comorbidities and postoperative complications on mortality after hip fracture in elderly people: prospective observational cohort study. BMJ 2005; 331(7529):1374.

181. Diamantopoulos AP, Hoff M, Skoie IM et al. Short- and long-term mortality in males and females with fragility hip fracture in Norway. A population-based study. Clin. Interv. Aging 2013; 8:817–823.

182. Tajeu GS, Delzell E, Smith W et al. Death, Debility, and Destitution Following Hip Fracture. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2013. doi:10.1093/gerona/glt105.

183. Koike Y, Imaizumi H, Takahashi E et al. Determining factors of mortality in the elderly with hip fractures. Tohoku J. Exp. Med. 1999; 188(2):139–142.

184. Alegre-López J, Cordero-Guevara J, Alonso-Valdivielso JL, Fernández-Melón J. Factors associated with mortality and functional disability after hip fracture: an inception cohort study. Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA 2005; 16(7):729–736.

185. Kannegaard PN, van der Mark S, Eiken P, Abrahamsen B. Excess mortality in men compared with women following a hip fracture. National analysis of comedications, comorbidity and survival. Age Ageing 2010; 39(2):203–209.

186. Bentler SE, Liu L, Obrizan M et al. The aftermath of hip fracture: discharge placement, functional status change, and mortality. Am. J. Epidemiol. 2009; 170(10):1290–1299.

187. Rosencher N, Vielpeau C, Emmerich J et al. Venous thromboembolism and mortality after hip fracture surgery: the ESCORTE study. J. Thromb. Haemost. JTH 2005; 3(9):2006–2014.

188. Pande I, Scott DL, O'Neill TW et al. Quality of life, morbidity, and mortality after low trauma hip fracture in men. Ann. Rheum. Dis. 2006; 65(1):87–92.

189. Baëhl S, Garneau H, Le Page A et al. Altered neutrophil functions in elderly patients during a 6-month follow-up period after a hip fracture. Exp. Gerontol. 2015; 65:58–68.

190. Sun T, Wang X, Liu Z et al. Plasma concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines and outcome prediction in elderly hip fracture patients. Injury 2011; 42(7):707–713.

191. Vallet H, Chenevier-Gobeaux C, Villain C et al. Prognostic Value of Serum Procalcitonin After Orthopedic Surgery in the Elderly Population. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2017; 72(3):438–443.

192. Neerland BE, Hall RJ, Seljeflot I et al. Associations Between Delirium and Preoperative Cerebrospinal Fluid C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Interleukin-6 Receptor in Individuals with Acute Hip Fracture. J. Am. Geriatr. Soc. 2016; 64(7):1456–1463.

193. Cape E, Hall RJ, van Munster BC et al. Cerebrospinal fluid markers of neuroinflammation in delirium: a role for interleukin-1β in delirium after hip fracture. J. Psychosom. Res. 2014; 77(3):219–225.

194. Larsen M, Bayard C, Lepetitcorps H et al. Elevated Neopterin Levels Predict Early Death in Older Hip-fracture Patients. EBioMedicine 2017; 26:157–164.

195. Gieseg SP, Baxter-Parker G, Lindsay A. Neopterin, Inflammation, and Oxidative Stress: What Could We Be Missing? Antioxid. Basel Switz. 2018. doi:10.3390/antiox7070080.

196. Hoffmann G, Wirleitner B, Fuchs D. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al 2003; 52(8):313–321.

197. Yang YT, Whiteman M, Gieseg SP. Intracellular glutathione protects human monocyte-derived macrophages from hypochlorite damage. Life Sci. 2012; 90(17–18):682–688.

198. Duggan S, Rait C, Gebicki JM, Gieseg SP. Inhibition of protein oxidation by the macrophage-synthesised antioxidant 7,8-dihydroneopterin. Redox Rep. Commun. Free Radic. Res. 2001; 6(3):188–190.

199. Shchepetkina AA, Hock BD, Miller A et al. Effect of 7,8-dihydroneopterin mediated CD36 down regulation and oxidant scavenging on oxidised low-density lipoprotein induced cell death in human macrophages. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2017; 87:27–33.

200. Widner B, Mayr C, Wirleitner B, Fuchs D. Oxidation of 7,8-dihydroneopterin by hypochlorous acid yields neopterin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 275(2):307–311.

201. Gieseg SP, Cato S. Inhibition of THP-1 cell-mediated low-density lipoprotein oxidation by the macrophage-synthesised pterin, 7,8-dihydroneopterin. Redox Rep. Commun. Free Radic. Res. 2003; 8(2):113–115.

202. Nathan CF. Peroxide and pteridine: a hypothesis on the regulation of macrophage antimicrobial activity by interferon gamma. Interferon 1986; 7:125–143.

203. Wöll E, Weiss G, Fuchs D et al. Effect of pteridine derivatives on intracellular calcium concentration in human monocytic cells. FEBS Lett. 1993; 318(3):249–252.

204. Kilbourn RG, Traber DL, Szabó C. Nitric oxide and shock. Dis.--Mon. DM 1997; 43(5):277–348.

205. Hoffmann T, Faust J, Neubert K, Ansorge S. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) and aminopeptidase N (CD 13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. FEBS Lett. 1993; 336(1):61–64.

206. Razumovitch JA, Semenkova GN, Fuchs D, Cherenkevich SN. Influence of neopterin on the generation of reactive oxygen species in human neutrophils. FEBS Lett. 2003; 549(1–3):83–86.

207. Kojima S, Nomura T, Icho T et al. Inhibitory effect of neopterin on NADPH-dependent superoxide-generating oxidase of rat peritoneal macrophages. FEBS Lett. 1993; 329(1–2):125–128.

208. Adamik B, Kübler-Kielb J, Golebiowska B et al. Effect of sepsis and cardiac surgery with cardiopulmonary bypass on plasma level of nitric oxide metabolites, neopterin, and

procalcitonin: correlation with mortality and postoperative complications. Intensive Care Med. 2000; 26(9):1259–1267.

209. Melichar B, Spisarová M, Bartoušková M et al. Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients. Ann. Transl. Med. 2017; 5(13):280.

210. El-Lebedy D, Hussein J, Ashmawy I, Mohammed AM. Serum level of neopterin is not a marker of disease activity in treated rheumatoid arthritis patients. Clin. Rheumatol. 2017; 36(9):1975–1979.

211. Weiss G, Willeit J, Kiechl S et al. Increased concentrations of neopterin in carotid atherosclerosis. Atherosclerosis 1994; 106(2):263–271.

212. Capuron L, Geisler S, Kurz K et al. Activated immune system and inflammation in healthy ageing: relevance for tryptophan and neopterin metabolism. Curr. Pharm. Des. 2014; 20(38):6048–6057.

213. Solichova D, Melichar B, Blaha V et al. Biochemical profile and survival in nonagenarians. Clin. Biochem. 2001; 34(7):563–569.

214. Migdal C, Serres M. [Reactive oxygen species and oxidative stress]. Med. Sci. MS 2011; 27(4):405–412.

215. Liguori I, Russo G, Curcio F et al. Oxidative stress, aging, and diseases. Clin. Interv. Aging 2018; 13:757–772.

216. Chandrasekaran A, Idelchik MDPS, Melendez JA. Redox control of senescence and age-related disease. Redox Biol. 2017; 11:91–102.

217. Richter T, von Zglinicki T. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. Exp. Gerontol. 2007; 42(11):1039–1042.

218. Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. J. Signal Transduct. 2012; 2012:646354.

219. Sawada M, Carlson JC. Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. Mech. Ageing Dev. 1987; 41(1–2):125–137.

220. Sohal RS, Dubey A. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. Free Radic. Biol. Med. 1994; 16(5):621–626.

221. Abete P, Napoli C, Santoro G et al. Age-related decrease in cardiac tolerance to oxidative stress. J. Mol. Cell. Cardiol. 1999; 31(1):227–236.

222. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI. Oxidized LDL and NO synthesis--Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. Mech. Ageing Dev. 2015; 151:101–113.

223. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. J. Alzheimers Dis. JAD 2017; 57(4):1105–1121.

224. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. Int. J. Cancer 2007; 121(11):2381–2386.

225. Wang Z, Ehnert S, Ihle C et al. Increased oxidative stress response in granulocytes from older patients with a hip fracture may account for slow regeneration. Oxid. Med. Cell. Longev. 2014; 2014:819847.

226. Delano MJ, Ward PA. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. Immunol. Rev. 2016; 274(1):330–353.

227. Patil NK, Bohannon JK, Sherwood ER. Immunotherapy: A promising approach to reverse sepsis-induced immunosuppression. Pharmacol. Res. 2016; 111:688–702.

228. Shalova IN, Lim JY, Chittezhath M et al. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1α. Immunity 2015; 42(3):484–498.

229. Kiers HD, Scheffer G-J, van der Hoeven JG et al. Immunologic Consequences of Hypoxia during Critical Illness. Anesthesiology 2016; 125(1):237–249.

230. Corcoran SE, O'Neill LAJ. HIF1α and metabolic reprogramming in inflammation. J. Clin. Invest. 2016; 126(10):3699–3707.

231. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Mol. Pharmacol. 2006; 70(5):1469–1480.

232. Cheng S-C, Quintin J, Cramer RA et al. mTOR- and HIF-1α-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. Science 2014; 345(6204):1250684.

233. Rius J, Guma M, Schachtrup C et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. Nature 2008; 453(7196):807–811.

234. Walmsley SR, Print C, Farahi N et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. J. Exp. Med. 2005; 201(1):105–115.

235. Scholz CC, Cavadas MAS, Tambuwala MM et al. Regulation of IL-1β-induced NF-κB by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013; 110(46):18490–18495.

236. Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. Cell 2002; 110(2):191–202.

237. Peyssonnaux C, Datta V, Cramer T et al. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. J. Clin. Invest. 2005; 115(7):1806–1815.

238. Peyssonnaux C, Cejudo-Martin P, Doedens A et al. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 2007; 178(12):7516–7519.

239. Mahabeleshwar GH, Qureshi MA, Takami Y et al. A myeloid hypoxia-inducible factor 1α-Krüppel-like factor 2 pathway regulates gram-positive endotoxin-mediated sepsis. J. Biol. Chem. 2012; 287(2):1448–1457.

240. Clambey ET, McNamee EN, Westrich JA et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012; 109(41):E2784-2793.

241. Schäfer ST, Frede S, Winning S et al. Hypoxia-inducible factor and target gene expression are decreased in patients with sepsis: prospective observational clinical and cellular studies. Anesthesiology 2013; 118(6):1426–1436.

242. Baëhl S, Garneau H, Lorrain D et al. Alterations in Monocyte Phenotypes and Functions after a Hip Fracture in Elderly Individuals: A 6-Month Longitudinal Study. Gerontology 2016; 62(5):477–490.

243. Forget P, Dillien P, Engel H et al. Use of the neutrophil-to-lymphocyte ratio as a component of a score to predict postoperative mortality after surgery for hip fracture in elderly subjects. BMC Res. Notes 2016; 9:284.

244. Duggal NA, Upton J, Phillips AC, Lord JM. Development of depressive symptoms post hip fracture is associated with altered immunosuppressive phenotype in regulatory T and B lymphocytes. Biogerontology 2016; 17(1):229–239.

245. Miyara M, Chader D, Sage E et al. Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2015; 112(23):7225–7230.

246. Xia Q, Wei L, Zhang Y et al. Immune Checkpoint Receptors Tim-3 and PD-1 Regulate Monocyte and T Lymphocyte Function in Septic Patients. Mediators Inflamm. 2018; 2018:1632902.

247. Huang X, Venet F, Wang YL et al. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009; 106(15):6303–6308.

248. Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z et al. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. J. Exp. Med. 2015; 212(4):447–456.

249. Pachot A, Cazalis M-A, Venet F et al. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. J. Immunol. Baltim. Md 1950 2008; 180(9):6421–6429.

250. Hoffmann G, Kenn S, Wirleitner B et al. Neopterin induces nitric oxide-dependent apoptosis in rat vascular smooth muscle cells. Immunobiology 1998; 199(1):63–73.

251. Rimmelé T, Payen D, Cantaluppi V et al. IMMUNE CELL PHENOTYPE AND FUNCTION IN SEPSIS. Shock Augusta Ga 2016; 45(3):282–291.

252. Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. Science 2014; 345(6204):1251086.

253. Guralnik JM, Ferrucci L, Pieper CF et al. Lower extremity function and subsequent disability: consistency across studies, predictive models, and value of gait speed alone compared with the short physical performance battery. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2000; 55(4):M221-231.

254. Schroecksnadel S, Sucher R, Kurz K et al. Influence of immunosuppressive agents on tryptophan degradation and neopterin production in human peripheral blood mononuclear cells. Transpl. Immunol. 2011; 25(2–3):119–123.

255. Balogh A, Mittermayr M, Schlager A et al. Mechanism of neopterin-induced myocardial dysfunction in the isolated perfused rat heart. Biochim. Biophys. Acta 2005; 1724(1–2):17–22.

256. Cermik H, Taslipinar MY, Aydin I et al. The relationship between N-acetylcysteine, hyperbaric oxygen, and inflammation in a rat model of acetaminophen-induced nephrotoxicity. Inflammation 2013; 36(5):1145–1152.

257. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. J. Pineal Res. 1995; 18(1):1–11.

258. Hardeland R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. J. Pineal Res. 2018; 65(4):e12525.

259. Dokumacioglu E, Iskender H, Aktas MS et al. The effect of sulforaphane on oxidative stress and inflammation in rats with toxic hepatitis induced by acetaminophene. Bratisl. Lek. Listy 2017; 118(8):453–459.

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Représentation schématique du vieillissement
Figure 2 : Augmentation de la fréquence des comorbidités avec l'âge.
Figure 3 : Mécanismes de l'immunosenescence et retentissement clinique
Figure 4: Représentation schématique du vieillissement lymphocytaire T.
Figure 5: Schéma de synthèse des interactions entre le système neuroendocrinien et immunitaire au cours d'un stress aigu
Figure 6 : Voies de formation de la néoptérine
Figure 7 : Voies d'induction de la néoptérine
Figure 8 : Formation des espèces réactive de l'oxygène
Figure 9 : Reprogrammation du monocyte au cours du sepsis
Figure 10 : Boucle de régulation des phénomènes inflammatoires associés à la fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF).
Figure 11: Phénotypage en sang frais des monocytes et des polynucléaires neutrophiles
Figure 12: Phénotypage des lymphocytes T régulateurs
Figure 13: Stratégie d'analyse pour déterminer l'induction de cytokines par les monocytes
Figure 14: Stratégie d'analyse pour déterminer l'induction de la mort cellulaire des différentes populations par la néoptérine
Figure 15 : Analyse longitudinale et comparaison de la numération formule sanguine des patients fracturés et contrôles
Figure 16 : Comparaison des concentrations plasmatiques de néoptérine entre les patients décédés et survivants à 1 an
Figure 17 : Expression de HLA-DR au sein des monocytes
Figure 18: Analyse des sous populations monocytaires
Figure 19 : Analyse de l'expression de CX3CR1 au sein des sous populations monocytaires
Figure 20 : Analyse de l'expression de CCR2 au sein des sous populations monocytaires
Figure 21 : Comparaison de la proportion de polynucléaires neutrophiles

Figure 22 : Analyse des sous populations de polynucléaires neutrophiles
Figure 23 : Numération des lymphocytes T (LT) CD4+ et CD8+
Figure 24 : Numération des lymphocytes T régulateurs (LTreg) $CD127^{low}$ $CD25^{high}$ FOXP3+
Figure 25 : Proportion de LTreg CD15s+ au sein des $CD127^{low}$ $CD25^{high}$ FOXP3+
Figure 26 : Expression de LAG-3 et de PD-1 au sein des monocytes
Figure 27 : Expression de 4-1BB (CD137) et de 2-B4 (CD244) au sein des monocytes
Figure 28 : Expression de 2-B4 (CD244) au sein des LT CD8+ mémoires
Figure 29 : Expression de LAG-3 au sein des LT CD4+ mémoires
Figure 30: Expression de LAG-3 et de PD-1 au sein des LT CD8+ mémoires
Figure 31 Synthèse de l'analyse phénotypique des patients suite à une FESF.
Figure 32 : Comparaison de la capacité de sécrétion d'IL-6 par les sous types de monocytes après stimulation par le LPS
Figure 33 : Comparaison de la capacité de sécrétion d'IL-8 et d'Il-1β par les sous types de monocytes après stimulation par le LPS
Figure 34 : Comparaison de la capacité de sécrétion d'IL-10 et de TGF-β par les sous types de monocytes après stimulation par le LPS
Figure 35 : Modification de l'expression des gènes d'intérêt (ARNm) chez les patients décédés (n=10) comparativement aux survivants (n=10)
Figure 36 Synthèse de l'étude de la fonctionnalité et de la reprogrammation du monocyte après une FESF
Figure 37 : Schéma de synthèse des voies induites par les enzymes synthétisées par le monocyte sous l'influence de l'IFNγ (IDO et GCH-1).
Figure 38 : Taux plasmatiques des métabolites du tryptophane
Figure 39: Induction de la production de néoptérine (nmol/l) par les PBMCs en culture après stimulation par différents inducteurs.
Figure 40 : Production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes en culture après stimulation par différentes doses de néoptérine
Figure 41 : Induction de la mort cellulaire au sein des LT (A) et des monocytes (B) par différentes doses de néoptérine
Figure 42 : Production de ROS par les PBMCs induite par la néoptérine
Figure 43 : Evaluation de la peroxydation des lipides dans le plasma des patients par la mesure de la concentration en malondialdéhyde (MDA)

Tableaux

Tableau 1 : Score de Charlson

Tableau 2 : Score de CIRS

Tableau 3 : Principales modifications induites par le vieillissement sur les cellules du système immunitaire

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage en sang frais des monocytes et neutrophiles

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour le phénotypage des LT régulateurs

Tableau 6 : liste des anticorps utilisés pour le phénotypage des check-point au sein des LT

Tableau 7 : Stimulation des monocytes : liste des anticorps utilisés pour le marquage membranaire

Tableau 8 : Stimulation des monocytes : liste des anticorps utilisés pour le marquage intracellulaire

Tableau 9 : Séquences des amorces spécifiques utilisées en qPCR

Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage de mort cellulaire

Tableau 11 : Induction de cytokines après stimulation par la néopterine : liste des anticorps utilisés pour le marquage membranaire.

Tableau 12: Induction de cytokines après stimulation par la néopterine : liste des anticorps utilisés pour le marquage intracellulaire

Tableau 13 : Caractéristiques cliniques de la cohorte de patients

ANNEXES

En annexe sont présentées 1 article original en cours de soumission (Journal of Gerontology) et 2 revues écrites au cours de ma thèse et publiées sur invitation des éditeurs dans Experimental Gerontology (2018) et dans la Revue de Médecine Interne (2019)

Hip fracture leads to transitory immune scar in older patients

Hélène Vallet[1,2*], Charles Bayard[1*], Hélène Lepetitcorps[1], Jessica O'Hana[1], Solène Fastenackels[1], Tinhinane Fali[1], Judith Cohen-Bittan[2], Frédéric Khiami[1,3], Jacques Boddaert[1,2], Delphine Sauce[1]

1. Sorbonne Université, INSERM, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Cimi-Paris), Paris, France.
2. Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Pitié-Salpétrière, Department of Geriatrics, Paris, France.
3. APHP, Hôpital Pitié-Salpétrière, Department of Orthopedic Surgery, Paris, France.

Corresponding author

Delphine Sauce, Sorbonne Université, INSERM U 1135, CIMI-Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France. Phone: +33-1-40-77-98-89. E-mail: delphine.sauce@upmc.fr

Word counts
Number of Figure
Number of Table

ABSTRACT

Background: Hip fracture (HF) is common in the geriatric population and is associated with a poor vital and functional prognosis which could be impacted by immunological changes. The objective here is to decipher immune changes occurring in the first days following HF and determine how phenotype, function and regulation of innate and adaptive compartments adapt during acute stress event.

Methods: We included HF patients, aged over 75 years. For each patient, blood samples were taken at 5 different timepoints: four in the perioperative period (day 0 to hospital discharge) and one at long term (6-12 months). Phenotypical and functional analysis were performed longitudinally on fresh blood or cryopreserved PBMCs. Clinical data were prospectively collected.

Results: 100 HF patients and 60 age-matched healthy controls were included. Innate compartment exhibits pro-inflammatory phenotypes (hyperleukocytosis, increase of CD14+ CD16+ proportion and CCR2 expression), maintaining its ability to produce pro-inflammatory cytokines. Adaptive compartment extends toward a transitory immunosuppressive profile (leucopenia) associated with an active T-cell proliferation. Furthermore, increases of LAG-3 and PD-1 and a decrease of 2-B4 expression are observed on T-cells, reinforcing their transitory suppressive status. Of note, these immune changes are transitory and sequential but may participate to a regulation loop necessary for homeostatic immune control at long term.

Conclusion: HF is associated with several transitory immunological changes including pro-inflammatory phenotype in innate compartment and immunosuppressive profile in adaptive compartment. A comprehensive assessment of immune mechanisms implicated in the patient's prognosis after HF could pave the way to develop new immune therapeutics strategies.

INTRODUCTION

Worldwide, 1.6 million of patients suffer of hip fracture (HF) each year, notably in the aged population [1]. This frequent pathology is associated with a poor prognosis with high mortality rate (20-30% of one-year mortality) and a decrease of functional autonomy [2–4]. Main factors associated with death are not directly due to the HF and/or its treatment but are represented by comorbidities decompensations (cardio-vascular events) and secondary infections [5]. The fall, and consequently the HF generates an important acute stress that impacts organism and could induces immunological changes [6,7]. Immune system is impacted by aging. Immunosenescence is characterized by phenotypical and functional changes that affect innate and adaptive compartments. Phagocytosis and chimiotactism of innate cells (monocytes, macrophages or neutrophils) are decreased. The pool of naïve T cells decreases due to the thymic involution [8] and there is a shrinking of TCR repertoire [9]. Furthermore, older patients present an elevated level of pro-inflammatory cytokines called “Inflam-aging” [10].

Several studies have shown immunological changes after HF. Neutrophils exhibit functional alterations with a defect in phagocytosis ability and superoxide production [6]. Conventional monocytes switch towards inflammatory phenotype with an increased production of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) [11].

Finally, HF prognosis has been associated with an increase of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF-α) and few biomarkers have been described (c-reactive protein, procalcitonin) [7,12]. In a previous study, we observed that pre-operative rate of neopterin (a molecule secreted by myeloid lineage under IFN-γ stimulation) was strongly associated with long-term mortality [13]. The objective of this longitudinal study is to decipher immune changes occurring in the first days following HF and

determine how phenotype, function and regulation of innate and adaptive compartments adapt during acute stress event.

MATERIAL AND METHODS

1. Patients cohort

We included hip fracture patients, aged over 75 years admitted between 2013-2015 and 2017-2018 in emergency department of Pitié Salpêtrière hospital. Patients with metastatic fracture, history of cancer, autoimmune disease and/or immunosuppressive treatment were excluded. For each patient, five blood sample were taken at different timepoints: in pre-operative period (Pre), 24 hours after surgery (Post), between day 3 and 5 of hospitalization usually (Hosp), then at patient hospital discharge (Discharge) and finally at long term post-surgery (6 -12 months; Long term). Healthy individuals matched for age were included in geriatric department and a unique blood sample was collected. One milliliter of fresh blood was immediately used for cell count and innate phenotyping. PBMCs (isolated by density gradient centrifugation) and plasma were cryopreserved until use.

Clinical data including age, sex, comorbidity scale (Cumulative Illness Rating Scale, CIRS), functional status and frailty scale (Activity of daily living (ADL), Instrumental activity of daily living (IADL), Clinical Frailty Scale (CFS)) at admission and functional and vital status at long term (6-12 months) were prospectively collected.

This study was approved by the ethics committee (CPP Pitié-Salpêtrière, Paris, France). All participants included were informed and gave their consent. The database was recorded to the French National Commission for Computing and Liberty (CNIL, Paris, France).

2. Flow cytometry analysis

2.1 Staining on fresh cells :

Innate phenotyping

Directly conjugated antibodies were obtained from the following vendors: BD Biosciences (San Jose, CA): CD3 (FITC), CD14 (BV605), HLADR (PE-CF594), CD16 (APC-H7); R&D systems: CCR2 (APC); eBioscience (San Diego, CA): CX3CR1 (PE), CD62L (PerCP-eF710). Staining for innate cell surface markers was performed with 100µl of fresh blood incubated 15min with antibodies. The blood was then lysed with BD FACS lysing, resuspended with PBS 1X (BD Biosciences) and immediately analyzed by flow cytometry.

Adaptive phenotyping

The percentages and absolute counts of lymphocyte subpopulations were determined in whole blood using CytoStat tetra-CHROME reagents (panel 1: CD45-FITC/ CD56-PE/ CD19-ECD and CD3-PC5; panel 2: CD45-FITC/ CD4-RD1/ CD8-ECD and CD3/PC5; Beckman Coulter, Hialeah, Florida). Sample acquisition with Flow-Count Fluorospheres was performed on a FC500flow cytometer (Beckman Coulter).

2.2 Staining on frozen cells:

Immune checkpoint phenotype

Directly conjugated antibodies were obtained from the following vendors: BD Biosciences (San Jose, CA): CCR7 (PC7), CD45-RA (V450), CD4 (HV500), HLA-DR (BV650), CD8 (APC-Cy7); BioLegend (San Diego, CA): PD1 (BV711), LAG3 (FITC), CD244/2B4 (PE). Staining was performed on cryopreserved PBMCs with standard method.

Homeostatic proliferation assay and activation status

Directly conjugated antibodies were obtained from the following vendors: BD Biosciences (San Jose, CA): CD4 (APC-cyanin7), CCR7 (PE-Cy7), CD38 (APC) and Ki67 (FITC); Beckman Coulter: CD45RA (ECD), Caltag (Burlingame, CA): CD8 (Alexa405); Dako (Glostrup, Denmark): CD3 (Cascade Yellow); BioLegend (San Diego, CA): CD27 (AlexaFluor700). Cell surface marker stainings were performed by addition of the respective antibodies for 15min at room temperature. After incubation, cells were washed in PBS and then permeabilized with Perm/fix kit (eBiosciences) before the addition of Ki67 antibody. Stainings were analyzed on an LSR2 flow cytometer (Becton Dickinson) with appropriate isotype controls and colour compensation.

CMV responsiveness

To assess functional capacity of HCMV specific CD8+ or CD4+ T cells, PBMC were stimulated with 15 amino acid long synthetic peptides (5μM) overlapping by 10 amino acids and spanning the two HCMV proteins, pp65. After 1 h, the secretion inhibitor brefeldin A (5 μg/mL; Sigma-Aldrich) was added and the incubation was continued overnight at 37 °C in a 5% CO2 atm. Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences) was used to fix/permeabilize the cells prior to staining for intracellular IFN-γ and TNF- α. The limit of detection for cytokine secretion was 0.01% in CD8+ or CD4+ T cell populations. “FunkyCells Boolean Dataminer” software (www.FunkyCells.com) provided by Dr Martin Larsen (INSERM U1135, Paris, France). Was used to determine the Polyfunctionality index in response to pp65 stimulation [14].

Monocyte function

Stained for cell surface markers (BD Biosciences San Jose, CA: CD14-BV605, HLA-DR BV650, CD16-APCH7, CD3-AF700) with standard method. PBMCs were washed in PBS, fixed in Cytofix/Cytoperm buffer (BD Biosciences), for 30 minutes at 4°C, washed, and stained in PermWash (BD Biosciences) with intra-cellular cell markers: IL8-BV510, TGFb- PE-CF594, TNFa-APC (BD Biosciences San Jose, CA); IL10-AF488 (R&D systems); : IL1b-PE (eBioscience, San Diego, CA); . : IL6- PECy7 (Biolegend, San Diego, CA) for 30 minutes at 4°C.

Data were analyzed using FlowJo v9 (Tree Star, Inc) and DIVA softwares (BD Biosciences).

3. Monocytes stimulation

PBMCs ($1X10^6$/well) were stimulated overnight at 37°C with LPS 10µg/ml (*E. coli* serotype O55:B5; Alexis Biochemicals). After one hour, Brefeldin (Sigma-Aldrich) was added (final concentration 1µg/ml). PBMCs were also resuspend with PBS for the flow cytometry analysis.

4. Statistical analysis

Data are expressed as frequencies and percentages for categorical variables and as medians and interquartile ranges (IQR) for continuous variables. Bivariable associations were evaluated with the use of MannWhitney U-test for continuous variables. All analyses were performed at a two-sided alpha level of 5%. A P-value of less than 0.05 was considered to significant. All analyses were performed with SPSS software, version 20 and Graph Pad Prism, version 5.

RESULTS

1. Patients characteristics

One hundred patients with HF and 60 healthy controls were included in this study. Main clinical characteristics are reported in the Supplementary Table 1. Patients with HF were 87 years old [83-92] and 27% were men. As expected, patients exhibit characteristics of geriatric population: they were comorbid (the median CIRS= 9 [7-13], polymedicated for 63% of them and mildly frailed (a median CFS = 5 [4-6]. At 12-months, 19 of them were deceased.

2. Immunophenotyping and function

Innate compartment

The total neutrophils and monocytes counts transitory increase in the pre-operative period comparatively to controls (Neutrophils $8.9X10^6/mm^3$ [7-10.9] vs $3.9X10^6/mm^3$ [3-4.9], p<0.0001; Monocytes $0.77X10^6/mm^3$ [0.57-0.94] vs $0.58X10^6/mm^3$ [0.43-0.72] p<0.0001) before cell counts normalization and return to baseline at long term (Figure 1A and 15), suggesting an immediate mobilization of the innate compartments.

Neutrophils subset were gated on size and structure as well as the combination of CD16+ and CD62L (Figure 1C, 1D) in order to differentiate inflammatory neutrophils (CD16+CD62L^{high}) from anti-inflammatory neutrophils (CD16+CD62Ll^{ow}). Their respective proportions are not significantly different from the control group (Figure 1C, 1D). Gating strategy of monocytes was represented in the figure…and relies on the combination of size, structure, HLA-DR, CD14 and CD16 expression. The proportion of intermediary monocytes (CD14+ CD16+), known as “inflammatory” monocytes [15], increased during hospitalization before return to baseline at long term (Figure 1H). On the contrary, the proportions of conventional and non-conventional monocytes decreased in post-operative period and during hospitalization comparatively to control

group and pre-operative period respectively (Figure 1G, 1I). Concerning CCR2 and CX3CR1 chemokines, known to be differentially expressed according to cell subsets, we observed that the expression of CCR2 within conventional monocytes increased significantly after HF to be maximal in the post-operative period (MFI 849 [637-1211] vs 442 [248-728], p=0.002) (Figure 1J, 1L) and this trend is the same whatever the monocytes subset (Supplementary Figure 1A, 1B). Inversely, the expression of CX3CR1 transitory decreased after HF to be minimal at the post-operative timepoint (MFI 10400 [3120-28896] vs 31427 [22395-37612], p=0.01) (Figure 1K, 1M) with the same trends for the other monocytes subset (Supplementary Figure 1C, 1D). These results suggest an increased turnover of monocyte/macrophage precursors in the bone marrow (decrease of CX3CR1 expression) [16] and an elevated monocyte migration from bone marrow to inflammatory site (increase of CCR2 expression).

Overall, these results suggest a transitory activation of the innate compartment after HF, followed by a normalization of the different phenomenons leading to a homeostatic return at long term. To evaluate monocytes function after HF, we analyzed their pro-inflammatory cytokines production under LPS stimulation. At each time points, monocytes are able to secrete IL-1b, IL-6, IL-8 and TNF-α without significant difference compared to healthy age-matched controls (Figure 2). Therefore, despite the hyper-inflammatory context of acute HF, functionality of monocytes to induce pro-inflammatory environment in response to acute stress is preserved after HF.

Adaptive compartment

Contrary to the innate cell subsets, we observed a significant and transitory lymphopenia after HF compared to control group (post-operative $0.94X10^6/mm^3$ [0.66-1.37] vs control $1.59X10^6/mm^3$ [1.13-1.9], p<0.0001) (Figure 3A). This lymphopenia is

significantly observed on T cells (CD3+, both for CD4+ and CD8+ cells) (Figure 3B, 3C, 3D), on B cells (CD19+) (Figure 3E) and on NK cells (CD3-CD56+) (Figure 3F). Of note, all subsets seem to be differentially affected: the lymphopenia is more sustained for the CD4+ proportionally to the CD8+ compartment; B cells recover faster during hospitalization whereas NK cells are mobilized at early timepoints post fracture (Supplementary Figure 2).

Altogether, these results suggest a transitory lymphosuppressive profile within adaptive compartment after HF.

To evaluate if this lymphopenic state results in compensatory mechanisms such as lymphopenia-induced proliferation through homeostatic signals, we measured their *ex vivo* proliferation capacity (Ki67 level) on naïve and memory T cell compartments. Whatever the subsets followed, we observed that T-cells isolated from elderly patients suffering from HF were proliferated during their stay to hospital in order to counteract the existing and persistent lymphopenia (Figure 4A, 4B, 4C, 4D).

This response to homeostatic signals was confirmed by the fact that T-cells were not activated (based on CD38+ expression) (Figure 4E, 4F).

Despite the absence of CMV reactivation during this acute clinical event (data not shown), we decided to evaluate *in vitro* the functionality of lymphocytes by analyzing their ability to response to pp65 antigens (which constitute the immunodominant responses described for CMV infection in elderly). Thus, taking into account the proportion of either CD4+, either CD8+ T-cells to secrete IFN-γ and/or TNF-α and/or IL-2, we found that T-cells in HF patients were as polyfunctional as healthy elderly controls (Figure 4G, 4H), suggesting that T-cells were fully functional and able to response to antigenic stimulation if necessary.

Immune checkpoint analysis

Previous results suggest an immunosuppressive profile within the adaptive compartment, without defect in functional capacities of T cells. We hypothesized that T-cells regulation, mediated by immune checkpoints, could be defective. The membrane expression of immune checkpoints inhibitors (PD-1 and LAG-3) and activator (2-B4) were analyzed on memory CD4+ and CD8+ T cells (Figure 5). The expression of immune checkpoints inhibitors significantly increases after HF compared to control. At long term their expression returns at controls level (Figure 5A, 5B, 5C, 5D). The maximal expression of LAG-3 is observed in post-operative timepoint within CD4+ (post-operative MFI: 240 [191-352] vs controls MFI:150 [133-176], p<0,0001) and CD8+ (post-operative MFI: 360 [272-429] vs controls MFI: 217 [190-245], p<0,0001) T cells (Figure 5C, 5D). Conversely, the expression of 2-B4 significantly decreases after HF compared to controls, within CD4+ and CD8+ with a minimal expression at post-operative timepoint (post-operative MFI: 81 [62-107] vs controls MFI: 190 [178-200], p=0,0001 and post-operative MFI: 307 [230-345] vs controls MFI: 423 [358-448], p=0,001 respectively) (Figure 5E, 5F).

These results reinforce the transitory suppressive status in adaptive compartment, occurring early after the HF and the recovery to the homeostatic status at long term.

DISCUSSION

The objective of this study was to pinpoint immune modifications occurring after HF which represents an acute assault that can accelerate abruptly the progressive health decline associated with aging.

In fact, HF represent an important geriatric problem with high level of mortality and loss of functional autonomy. Despite improvement of clinical care through specific orthopedic geriatric unit creation [17], part of mechanisms implicated in the bad prognosis of HF keep unknown and could be a key to enhance medical care.

Longitudinal analysis of immune modifications is a strength in our study. Indeed, the four early time points permitted to highlight that immune changes appear in first hours following HF. Most of the time, these alterations falling into place at hospital discharge or at long term. Another strength of this work is the size of the cohort and the population characteristics. Patients included are typical of geriatric population with age over 85 years old, multiple comorbidities, polymedication and frailty.

Our main results are: an increased number of innate compartments (neutrophils, monocytes) with a higher proportion of inflammatory monocytes in the first days following HF; a transitory decreased number of NK cells, T and B lymphocytes. Despite these differential mobilizations, cells keep their ability to respond to environmental stimuli or homeostatic signals.

Moreover, there is a defect in the regulation of T cells activation with an increase expression of immune checkpoint inhibitors and a decrease expression of immune checkpoint activators. In brief, there is shift to a pro-inflammatory phenotype in innate compartment and to an anti-inflammatory phenotype in the adaptive compartment in

the first day after HF. All these modifications are transitory forming a regulation loop before return at homeostatic status at long term.

HF represent an intense acute stress in old patients. It's induced systemic reaction and notably immune reactions. Another model of acute stress in geriatric population is the sepsis. For several years, immune modifications induce by sepsis are describe associating an intense pro-inflammatory phase called "cytokine storm" and a suppressive phase with some similarities with our results.

During sepsis, phenotypic changes in monocytes are quite similar to what we observed in the HF associating increased proportion of CD16+ monocytes and decreased expression of CX3CR1 [18–20]. In our study, we observed a decrease expression of CX3CR1 and an increase expression of CCR2 indicating an intense turnover and recruitment of monocytes from bone marrow enabling migration to the fracture site.

In the first day of sepsis, there is a major leukocytosis similar to what we observed in this study of HF. However, in sepsis, neutrophils acquire a pro-inflammatory profile associating a decrease in the expression of CD16 and L-selectin [21]. We did not observe differences in the expression of CD16 and L-selectin in our cohort. One hypothesis could be the bacterial origin of sepsis that intensely mobilized neutrophils as first line of defense against bacteria.

Concerning the adaptive compartment, early stage of sepsis is associated with global lymphopenia [22]. CD4+, CD8+, B cells and NK cells drastically decrease. Furthermore, inhibitory immune checkpoint (PD-1 and LAG-3) expression within T cells increase leading to T cells impairment and inhibition of innate cell function [23]. We observed similar results in our study reinforcing the hypothesis of immunosuppression within adaptive compartment.

If immune scar observed in HF is similar to the one observed in sepsis, it could be interesting to consider these 2 common complications in elderly populations as unique models to propose strategies to restore immunity after prolonged stress-induced immune suppression. A comprehensive assessment of immune mechanisms implicated in the patients prognosis after HF appears important and could pave the way to news immune therapeutics approach.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to the patients and staff of the department of geriatrics of the Pitié-Salpétrière Hospital. We acknowledge Martin Larsen for constructive scientific discussions and advices on statistics as well as Guislaine Carcelain and Amelie Guihot for the validation of routine immunological counts.

FUNDINGS

This work was supported by Sorbonne University (Emergence grant). HV is a recipient of Prix Lucienne Chaffoteaux/ Fondation de l'Avenir.

Author Contributions: H.V. performed experiments, analyzed the data and wrote the paper; C.B., S.F., T.F. performed experiments and analyzed the data; H.L., F.K. and J.C.B recruited patients and analyzed clinical data; J.B. designed clinical study, recruited patients and analyzed clinical data; D.S. designed research, performed experiments, analyzed the data and wrote the paper.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

REFERENCES

[1] Haentjens P, Magaziner J, Colón-Emeric CS, Vanderschueren D, Milisen K, Velkeniers B, et al. Meta-analysis: excess mortality after hip fracture among older women and men. Ann Intern Med 2010;152:380–90. doi:10.7326/0003-4819-152-6-201003160-00008.

[2] Diamantopoulos AP, Hoff M, Skoie IM, Hochberg M, Haugeberg G. Short- and long-term mortality in males and females with fragility hip fracture in Norway. A population-based study. Clin Interv Aging 2013;8:817–23. doi:10.2147/CIA.S45468.

[3] Tajeu GS, Delzell E, Smith W, Arora T, Curtis JR, Saag KG, et al. Death, Debility, and Destitution Following Hip Fracture. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2013. doi:10.1093/gerona/glt105.

[4] Magaziner J, Hawkes W, Hebel JR, Zimmerman SI, Fox KM, Dolan M, et al. Recovery from hip fracture in eight areas of function. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2000;55:M498-507.

[5] Rosencher N, Vielpeau C, Emmerich J, Fagnani F, Samama CM, ESCORTE group. Venous thromboembolism and mortality after hip fracture surgery: the ESCORTE study. J Thromb Haemost JTH 2005;3:2006–14. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01545.x.

[6] Baëhl S, Garneau H, Le Page A, Lorrain D, Viens I, Svotelis A, et al. Altered neutrophil functions in elderly patients during a 6-month follow-up period after a hip fracture. Exp Gerontol 2015;65:58–68. doi:10.1016/j.exger.2015.03.009.

[7] Sun T, Wang X, Liu Z, Chen X, Zhang J. Plasma concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines and outcome prediction in elderly hip fracture patients. Injury 2011;42:707–13. doi:10.1016/j.injury.2011.01.010.

[8] Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Duperrier A, Keller M, Grubeck-Loebenstein B, et al. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. J Clin Invest 2009;119:3070–8. doi:10.1172/JCI39269.

[9] Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. J Immunol Baltim Md 1950 2014;192:2689–98. doi:10.4049/jimmunol.1302064.

[10] Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. Mech Ageing Dev 2007;128:92–105. doi:10.1016/j.mad.2006.11.016.

[11] Baëhl S, Garneau H, Lorrain D, Viens I, Svotelis A, Lord JM, et al. Alterations in Monocyte Phenotypes and Functions after a Hip Fracture in Elderly Individuals: A 6-Month Longitudinal Study. Gerontology 2016;62:477–90. doi:10.1159/000443142.

[12] Vallet H, Chenevier-Gobeaux C, Villain C, Cohen-Bittan J, Ray P, Epelboin L, et al. Prognostic Value of Serum Procalcitonin After Orthopedic Surgery in the Elderly Population. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2017;72:438–43. doi:10.1093/gerona/glw097.

[13] Larsen M, Bayard C, Lepetitcorps H, Cohen-Bittan J, Appay V, Boddaert J, et al. Elevated Neopterin Levels Predict Early Death in Older Hip-fracture Patients. EBioMedicine 2017;26:157–64. doi:10.1016/j.ebiom.2017.11.003.

[14] Sauce D, Gorochov G, Larsen M. HIV-specific Th2 and Th17 responses predict HIV vaccine protection efficacy. Sci Rep 2016;6:28129. doi:10.1038/srep28129.

[15] Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. J Immunol Baltim Md 1950 2002;168:3536–42. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3536.

[16] White G, Greaves D. Fractalkine: a survivor's guide: chemokines as antiapoptotic mediators. Arter Thromb Vasc Biol 2012;32:589–94. doi:10.1161/ATVBAHA.111.237412.

[17] Boddaert J, Cohen-Bittan J, Khiami F, Le Manach Y, Raux M, Beinis J-Y, et al. Postoperative admission to a dedicated geriatric unit decreases mortality in elderly patients with hip fracture. PloS One 2014;9:e83795. doi:10.1371/journal.pone.0083795.

[18] Ferreira da Mota NV, Brunialti MKC, Santos SS, Machado FR, Assuncao M, Azevedo LCP, et al. Immunophenotyping of Monocytes During Human Sepsis Shows Impairment in Antigen Presentation: A Shift Toward Nonclassical Differentiation and Upregulation of FCγRi-Receptor. Shock Augusta Ga 2018;50:293–300. doi:10.1097/SHK.0000000000001078.

[19] Gainaru G, Papadopoulos A, Tsangaris I, Lada M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Pistiki A. Increases in inflammatory and CD14dim/CD16pos/CD45pos patrolling monocytes in sepsis: correlation with final outcome. Crit Care Lond Engl 2018;22:56. doi:10.1186/s13054-018-1977-1.

[20] Pachot A, Cazalis M-A, Venet F, Turrel F, Faudot C, Voirin N, et al. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. J Immunol Baltim Md 1950 2008;180:6421–9. doi:10.4049/jimmunol.180.9.6421.

[21] Rimmelé T, Payen D, Cantaluppi V, Marshall J, Gomez H, Gomez A, et al. IMMUNE CELL PHENOTYPE AND FUNCTION IN SEPSIS. Shock Augusta Ga 2016;45:282–91. doi:10.1097/SHK.0000000000000495.

[22] Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis M-A, Darbon R, et al. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. Shock Augusta Ga 2010;34:358–63. doi:10.1097/SHK.0b013e3181dc0977.

[23] Patil NK, Guo Y, Luan L, Sherwood ER. Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis. Int J Mol Sci 2017;18. doi:10.3390/ijms18112413.

LEGENDS

Figure 1: Longitudinal analysis of innate phenotype: (A) Number of neutrophils (10^3 cells/mm^3); (B) Gating strategy depicting neutrophils staining based on size/structure and CD62L / CD16 expression; (C) Percentage of inflammatory neutrophils expressing $CD16^+CD62L^{high}$; (D) Percentage of suppressive neutrophils expressing $CD16^+CD62L^{low}$; (E) Number of monocytes (10^3cells/mm^3); (F) Gating strategy depicting monocytes staining based on size/structure criteria, HLADR, CD14 and CD16 expression; (G) Percentage of conventional $CD14^+$ $CD16^-$ monocytes; (H) Percentage of intermediate $CD14^+$ $CD16^+$ monocytes; (I) Percentage of non-conventional $CD14^-$ $CD16^+$ monocytes; (J) Representative histogram of CCR2 expression within conventional monocytes (black; control isotype in grey overlay); (K) Representative histogram of CX3CR1 expression within non-conventional monocytes (black; control isotype in grey overlay); (L) CCR2 expression within conventional monocytes (expressed in mean fluorescence intensity); (M) CX3CR1 expression within non-conventional monocytes (expressed in mean fluorescence intensity). Data are plotted for healthy control individuals (CTR) or for hip fracture patients at different times of follow-up (pre-surgery: PRE; post-surgery: POST; during hospitalization: HOSP; at hospital discharge: DISCHARGE and between 6-12 months post fracture: LONG TERM). Each dot represents an individual. The lanes indicate the medians. Statistical significance is determined by the nonparametric Mann–Whitney test: p value < 0.05 was considered significant.

Figure 2: Ability of monocytes from HFP to produce pro-inflammatory cytokines upon stimulation. (A) Representative flow cytometry profile of cytokines secretion (TNF-α and IL-1β upper panel; IL-8 and IL-6 bottom panel) in unstimulated monocytes (US, left panel) or in LPS conditions (right panel).

Monocytes were identified according to size/structure, HLADR, CD14 and CD16 expression; (B) Percentages of monocytes secreting (B) TNF- α, (C) IL-1 β (D) IL-8 (E) IL-6. Data are plotted for healthy control individuals (CTR) or for hip fracture patients at different times of follow-up (pre-surgery: PRE; post-surgery: POST; during hospitalization: HOSP; at hospital discharge: DISCHARGE and between 6-12 months post fracture: LONG TERM). Each dot represents an individual. The lanes indicate the medians. Statistical significance is determined by the nonparametric Mann–Whitney test: p value <0.05 was considered significant.

Figure 3: Longitudinal analysis of adaptive phenotype: Number (10^3cells/mm3) of (A) total lymphocytes (B) T-cells (C) CD4+ T-cells (D) CD8+ T-cells (E) CD19+ B cells and of (F) CD56+ NK cells .

Data are plotted for healthy control individuals (CTR) or for hip fracture patients at different times of follow-up (pre-surgery: PRE; post-surgery: POST; during hospitalization: HOSP; at hospital discharge: DISCHARGE and between 6-12 months post fracture: LONG TERM). Each dot represents an individual. The lanes indicate the medians. Statistical significance is determined by the nonparametric Mann–Whitney test: p value <0.05 was considered significant.

Figure 4: Functionality of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in HF patients (longitudinal analysis) compared to control: Proliferation was evaluated by the % of cells expressed $Ki67^+$ for (A) CCR7+ CD45RA+ naïve $CD4^+$, (B) memory $CD4^+$, (C) CCR7+ CD45RA+ naïve $CD8^+$ and (D) memory $CD8^+$. Activation was evaluated by the % of cells expressed CD38+ within (E) memory $CD4^+$ and (F) $CD8^+$. Priming capacity was evaluated by the polyfunctionality index within (G) $CD4^+$ and (H) $CD8^+$.

Data are plotted for healthy control individuals (CTR) or for hip fracture patients at different times of follow-up (pre-surgery: PRE; post-surgery: POST; during hospitalization: HOSP; at hospital discharge: DISCHARGE and between 6-12 months post fracture: LONG TERM). Each dot represents an individual. The lanes indicate the medians. Statistical significance is determined by the nonparametric Mann–Whitney test: p value <0.05 was considered significant.

Figure 5: Longitudinal analysis of immune checkpoint expression within T cells: Surface membrane expression within (A) memory $CD4^+$ (left panel) and (B) memory $CD8^+$ T cells (right panel) for PD-1 (upper panel) LAG-3 (middle panel) and 2-B4 expression (bottom panel) All results are expressed in mean fluorescence intensity.

Data are plotted for healthy control individuals (CTR) or for hip fracture patients at different times of follow-up (pre-surgery: PRE; post-surgery: POST; during hospitalization: HOSP; at hospital discharge: DISCHARGE and between 6-12 months post fracture: LONG TERM). Each dot represents an individual. The lanes indicate the medians. Statistical significance is determined by the nonparametric Mann–Whitney test: p value <0.05 was considered significant.

Supplementary Table 1: Patients characteristics

Supplementary Figure 1: Longitudinal analysis of chemokines expression within monocytes subtype: CCR2 expression within (A) intermediate and (B) non-conventional monocytes (expressed in mean fluorescence intensity). CX3CR1 expression within intermediate (C) and conventional (D) monocytes (result expressed in mean fluorescence intensity).

Data are plotted for healthy control individuals (CTR) or for hip fracture patients at different times of follow-up (pre-surgery: PRE; post-surgery: POST; during hospitalization: HOSP; at hospital discharge: DISCHARGE and between 6-12 months post fracture: LONG TERM). Each dot represents an individual. The lanes indicate the medians. Statistical significance is determined by the nonparametric Mann–Whitney test: p value <0.05 was considered significant.

Supplementary Figure 2: Longitudinal analysis of adaptive phenotype: (A) % of $CD4^+$ T cells (B) % of $CD8^+$ T cells (C) % of $CD19^+$ (D) % of $CD56^+$.

Data are plotted for healthy control individuals (CTR) or for hip fracture patients at different times of follow-up (pre-surgery: PRE; post-surgery: POST; during hospitalization: HOSP; at hospital discharge: DISCHARGE and between 6-12 months post fracture: LONG TERM). Each dot represents an individual. The lanes indicate the medians. Statistical significance is determined by the nonparametric Mann–Whitney test: p value <0.05 was considered significant.

Figure 1

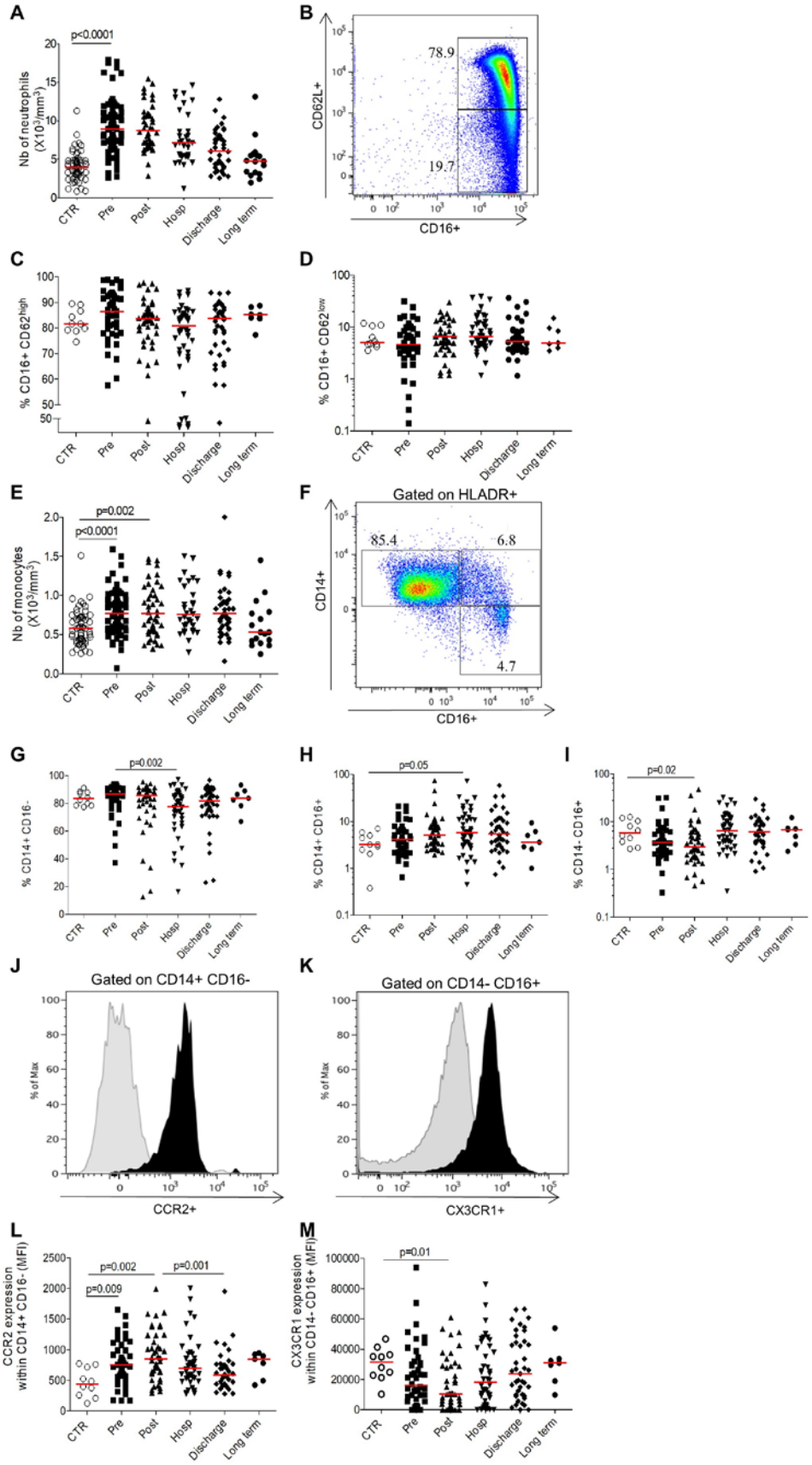

A
p<0.0001
Nb of neutrophils (X10³/mm³)
CTR
Pre
Post
Hosp
Discharge
Long term
B
78.9
19.7
CD62L+
CD16+
C
% CD16+ CD62high
D
% CD16+ CD62low
E
p=0.002
p<0.0001
Nb of monocytes (X10³/mm³)
F
Gated on HLADR+
85.4
6.8
4.7
CD14+
CD16+
G
p=0.002
% CD14+ CD16-
H
p=0.05
% CD14+ CD16+
I
p=0.02
% CD14- CD16+
J
Gated on CD14+ CD16-
% of Max
CCR2+
K
Gated on CD14- CD16+
CX3CR1+
L
p=0.002
p=0.009
p=0.001
CCR2 expression within CD14+ CD16- (MFI)
M
p=0.01
CX3CR1 expression within CD14- CD16+ (MFI)

Figure 2

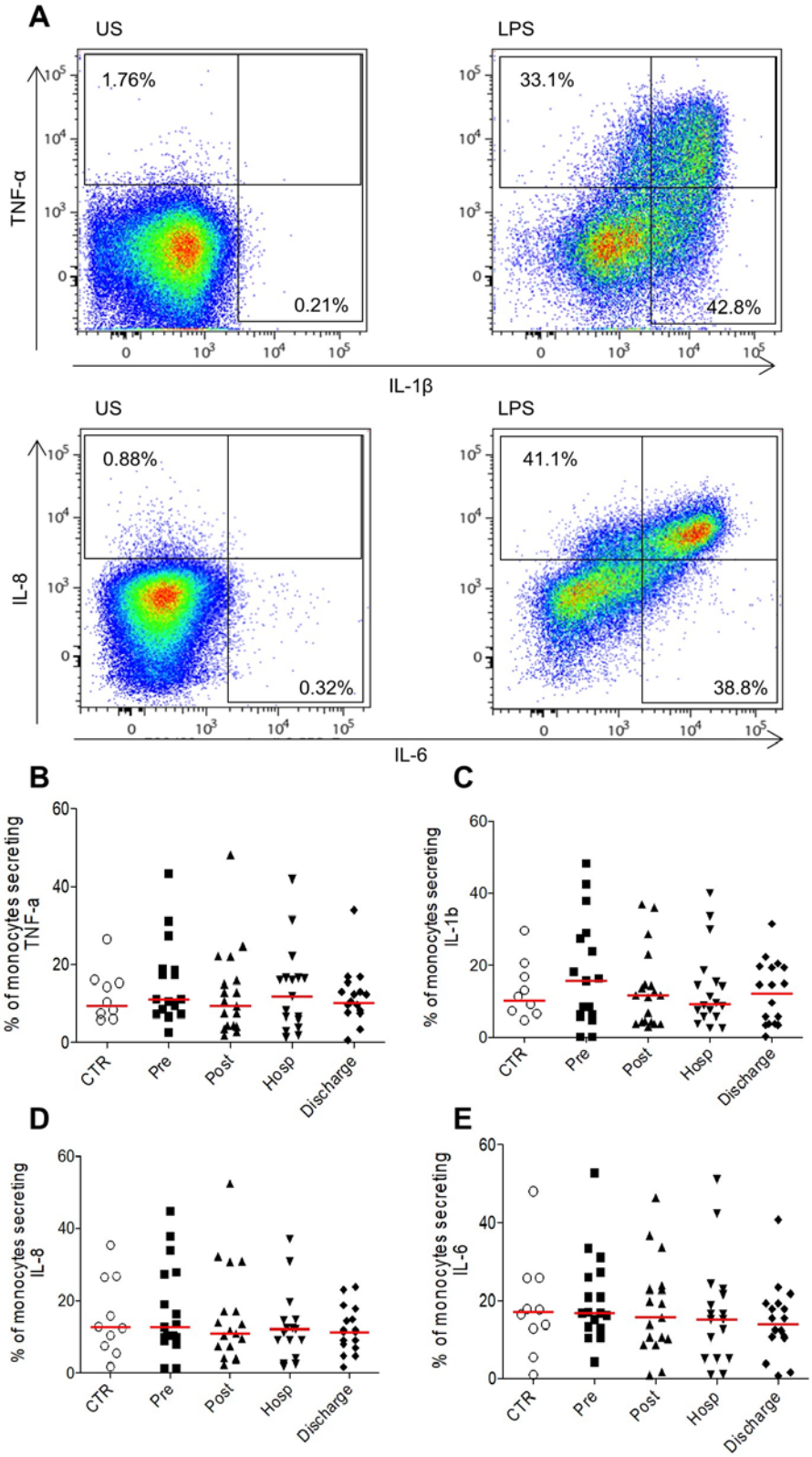

A
US
LPS
1.76%
0.21%
33.1%
42.8%
TNF-α
IL-1β
US
LPS
0.88%
0.32%
41.1%
38.8%
IL-8
IL-6
B
% of monocytes secreting TNF-a
C
% of monocytes secreting IL-1b
D
% of monocytes secreting IL-8
E
% of monocytes secreting IL-6
CTR
Pre
Post
Hosp
Discharge

Figure 3

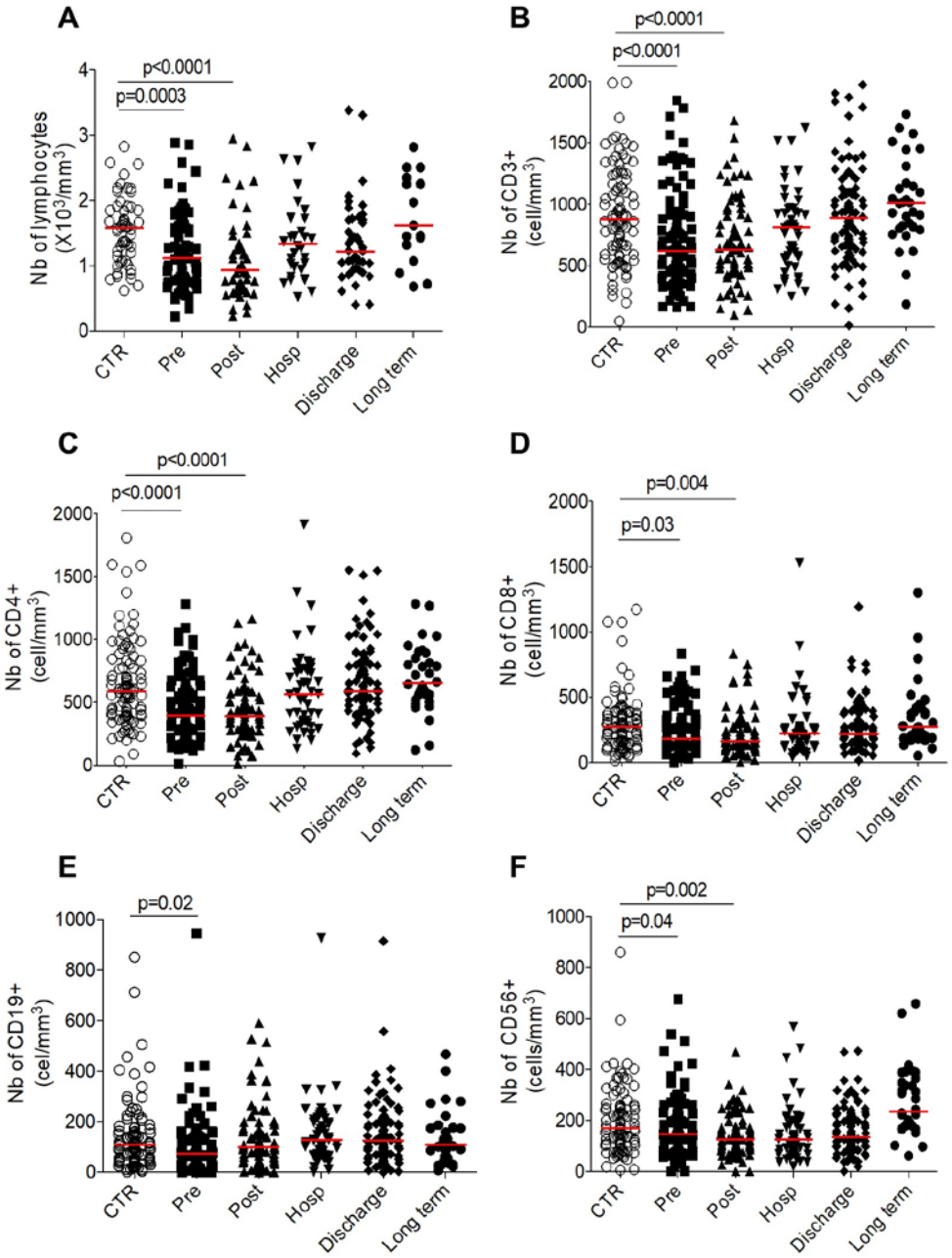

A
p<0.0001
p=0.0003
Nb of lymphocytes (X10³/mm³)
CTR
Pre
Post
Hosp
Discharge
Long term
B
p<0.0001
p<0.0001
Nb of CD3+ (cell/mm³)
C
p<0.0001
p<0.0001
Nb of CD4+ (cell/mm³)
D
p=0.004
p=0.03
Nb of CD8+ (cell/mm³)
E
p=0.02
Nb of CD19+ (cel/mm³)
F
p=0.002
p=0.04
Nb of CD56+ (cells/mm³)

Figure 4

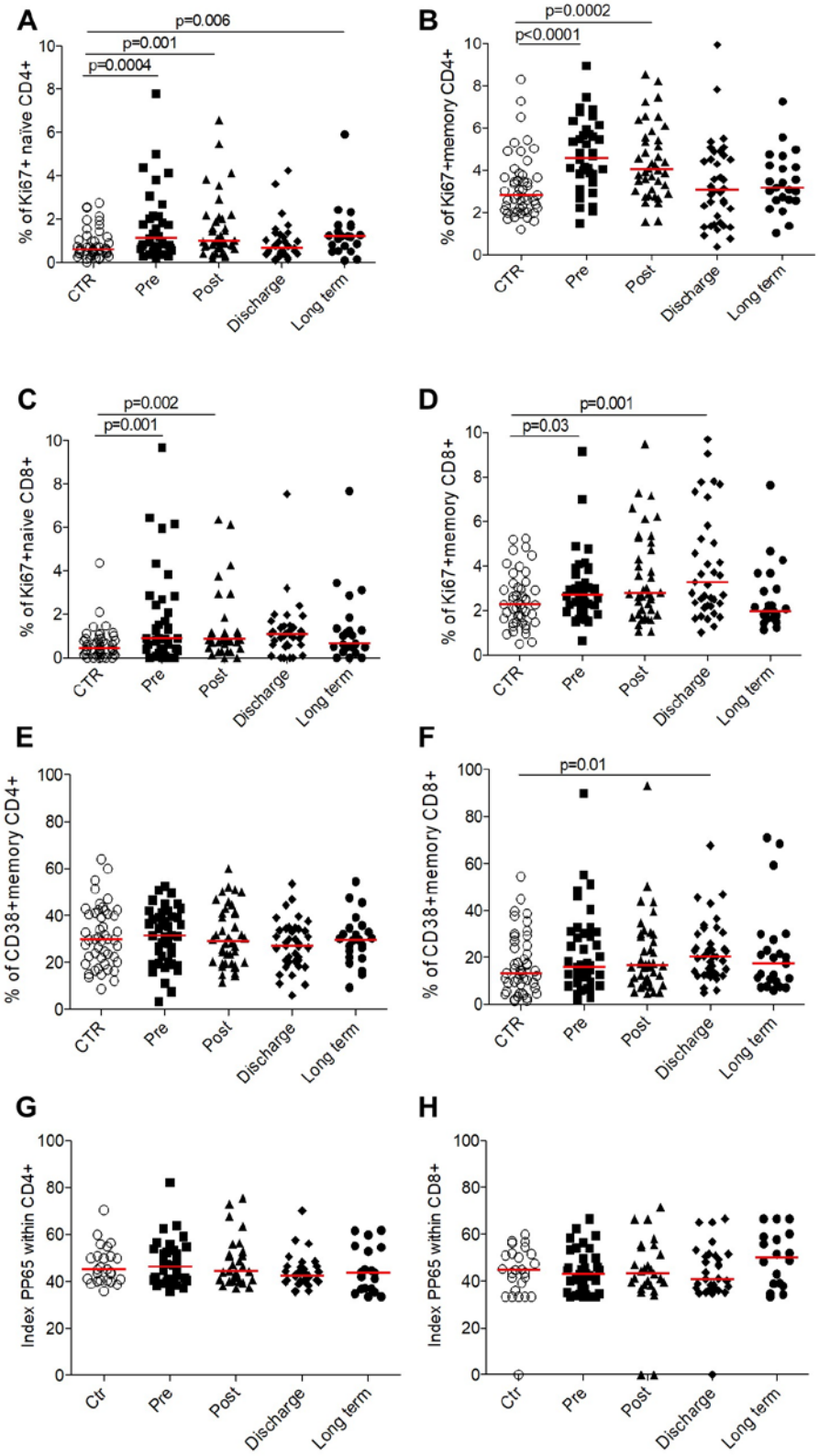
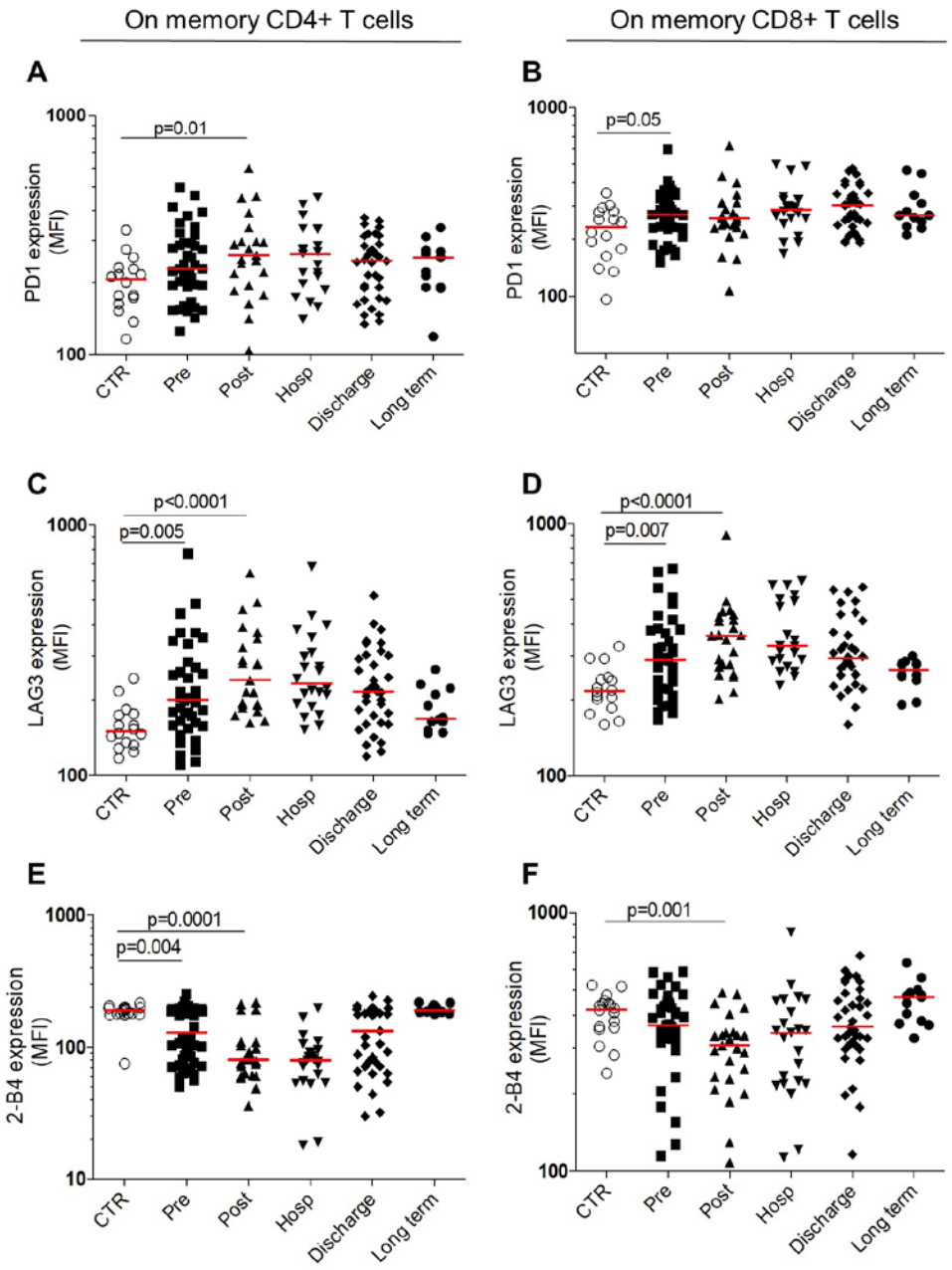

A
p=0.006
p=0.001
p=0.0004
% of Ki67+ naive CD4+
CTR
Pre
Post
Discharge
Long term
B
p=0.0002
p<0.0001
% of Ki67+memory CD4+
C
p=0.002
p=0.001
% of Ki67+naive CD8+
D
p=0.001
p=0.03
% of Ki67+memory CD8+
E
% of CD38+memory CD4+
F
p=0.01
% of CD38+memory CD8+
G
Index PP65 within CD4+
Ctr
H
Index PP65 within CD8+

Figure 5

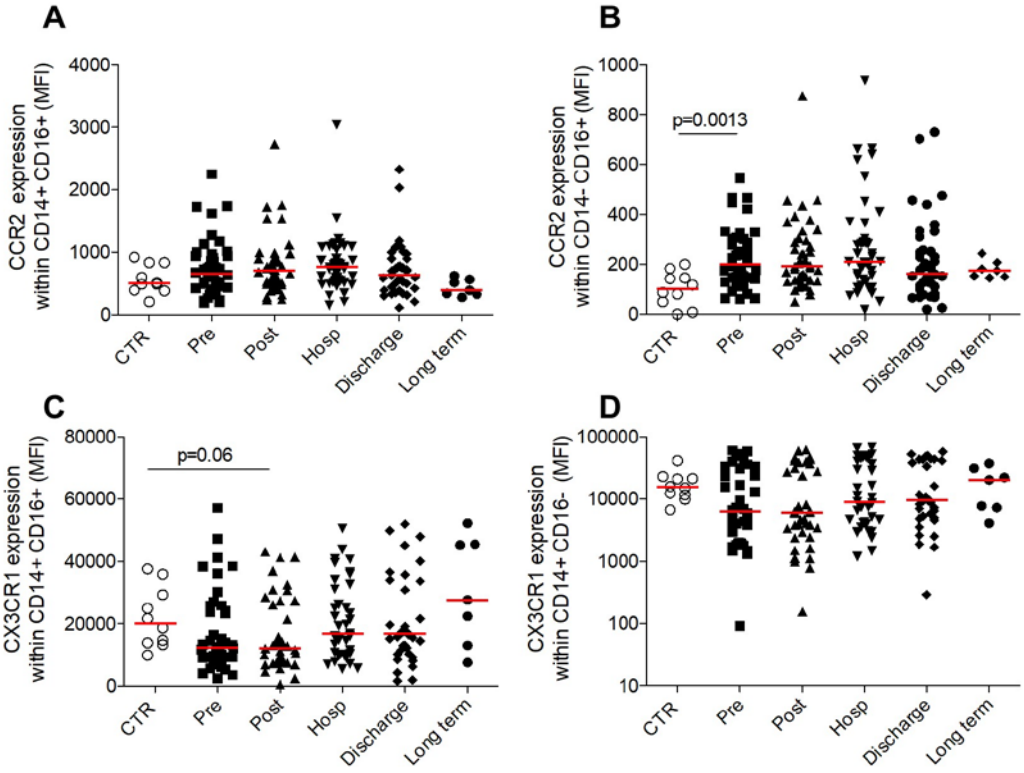
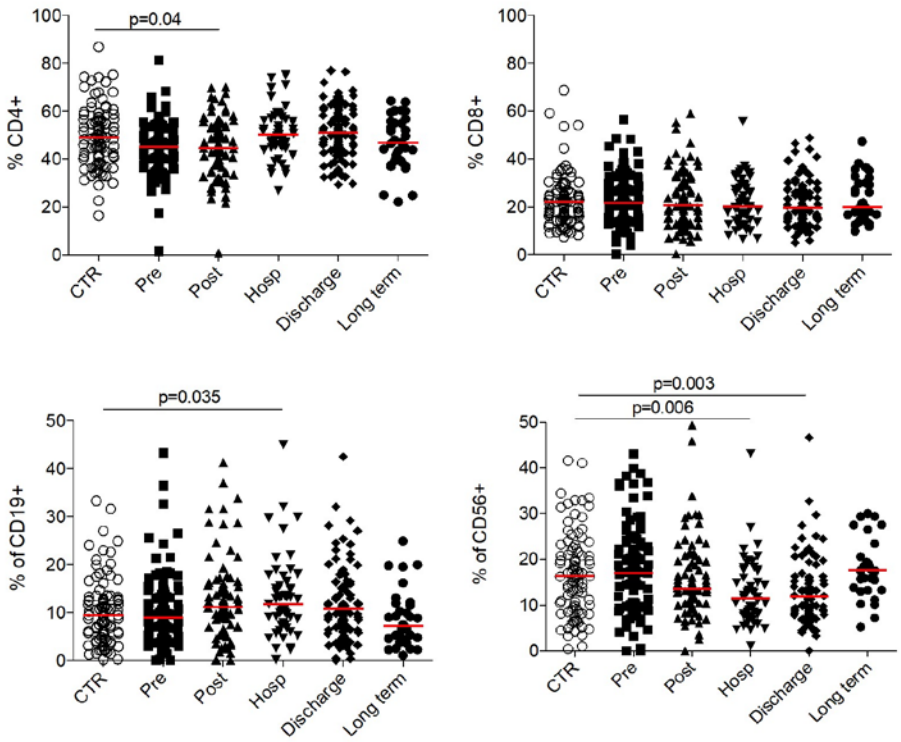

On memory CD4+ T cells
On memory CD8+ T cells
A
B
C
D
E
F
PD1 expression (MFI)
LAG3 expression (MFI)
2-B4 expression (MFI)
1000
100
10
p=0.01
p=0.05
p<0.0001
p=0.005
p<0.0001
p=0.007
p=0.0001
p=0.004
p=0.001
CTR
Pre
Post
Hosp
Discharge
Long term

Supplementary table 1: Patients characteristics

Variable	Hip fracture group (n=110)	Control group (n=60)
Age (years)	87 [83-92]	84 [80-89]
Male sex	30 (27.3%)	17 (28.3%)
Comorbidities		
CIRS	9 [7-13]	9 [6-12]
Dementia	46 (41.8%)	35 (58.3%)
Hypertension	74 (67.3%)	33 (55%)
Diabetes	16 (14.5%)	7 (11.7%)
Chronic cardiac failure	21 (19.1%)	5 (8.3%)
Chronic renal failure	67 (60.9%)	42 (70%)
COPD	8 (7.3%)	5 (8.3%)
Polymedication (≥5 drugs)	70 (63.6%)	37 (61.7%)
Frailty/functional autonomy		
CFS	5 [4-6]	4 [4-5]
ADL	6 [3.5-6]	6 [5-6]
IADL	2 [0.75-4]	3 [1-4]
Ability to walk	103 (93.6%)	59 (98.3%)
Type of fracture		
Intertrochanteric	55 (50%)	
Femoral neck	55 (50%)	
Number of post-operative complication	2 [1-4]	
Long term outcomes		
6-months mortality	17 (15.5%)	
12-months mortality	19 17.3%)	
ADL at 6 months# (n=48)	3 [2-6]	
IADL at 6 months# (n=48)	1 [0-3.25]	
Ability to walk at 6 months$ (n=68)	55 (80.9%)	

Data are median (25th–75th interquartile), or number (percentage). CIRS: Cumulative Illness Rating Scale, COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease, CFS: Clinical Frailty Scale, ADL: Activity of Daily Living, IADL: Instrumental Activity of Daily Living. #: n=48 $: n=68

Supplementary figure 1



Supplementary figure 2