



HAL
open science

Rôle et Fonction du transactivateur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CIITA) dans le sepsis bactérien

Jordi Miatello

► To cite this version:

Jordi Miatello. Rôle et Fonction du transactivateur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CIITA) dans le sepsis bactérien. Immunité innée. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ053 . tel-03955986

HAL Id: tel-03955986

<https://theses.hal.science/tel-03955986v1>

Submitted on 25 Jan 2023

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.

Rôle et fonction du transactivateur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CIITA) dans le sepsis bactérien

*Role and function of the major histocompatibility complex class II
transactivator (CIITA) in bacterial sepsis*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Immunologie
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institute for Integrative Biology of the Cell
(I2BC) (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS)**
sous la direction de **Pierre TISSIERES**, professeur des universités,
et le co-encadrement de **Luis AUGUSTO**, ingénieur de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 décembre 2022, par

Jordi MIATELLO

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Bernard MAILLÈRE Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Président
Karim ASEHNOUNE Professeur des universités, Nantes Université	Rapporteur & Examineur
Nuala MOONEY Directrice de recherche, Université Paris Cité	Rapporteuse & Examinatrice
Michele BONIOTTO Maître de conférences, Université Paris-Est Créteil	Examineur
Anne-Claire LUKASZEWICZ Professeure des universités, Université Lyon 1	Examinatrice
Walter REITH Professeur émérite, Université de Genève, Suisse	Examineur

Titre : Rôle et fonction du transactivateur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CIITA) dans le sepsis bactérien

Mots clés : CIITA, mHLA-DR, IFN- γ , sepsis, immunosuppression

Résumé : Le sepsis reste une cause importante de mortalité dans le monde. Le système immunitaire joue un rôle central dans la réponse à l'infection. L'état d'inflammation initial, déclenché par la réponse immunitaire innée, peut évoluer vers une auto-amplification incontrôlée et des défaillances d'organes. Parallèlement, afin d'en assurer le contrôle, une réponse négative anti-inflammatoire se met en place pouvant conduire à un état d'immunosuppression, pourvoyeur d'infections secondaires et de mortalité en soins intensifs. Cet état se caractérise par un déficit quantitatif et qualitatif de la réponse immunitaire. L'expression monocytaire de HLA-DR (mHLA-DR), molécule du CMH de classe II présentant l'antigène aux lymphocytes T, est à ce jour un marqueur pertinent de l'état d'immunosuppression induite par le sepsis. Son expression est régulée principalement par le transactivateur de classe II, CIITA, lui-même contrôlé au niveau transcriptionnel par une région hautement conservée située dans le promoteur. La mise en évidence dans cette région promotrice de polymorphismes génétiques, ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), impliqués dans des maladies inflammatoires, ainsi que des preuves d'une sélection positive dans la région 5' du gène, nous ont permis de cibler le SNP G-286A*rs3087456.

Dans la première partie de notre travail, nous avons démontré le rôle du SNP dans la diminution de l'activité du promoteur III de *CIITA*, la récupération de celle-ci après stimulation par IFN- γ , et son rôle dans la mortalité des patients en choc septique en lien avec la diminution de mHLA-DR.

Dans la suite de notre travail, nous avons présenté des données de sécurité et d'efficacité du traitement par IFN- γ chez des patients atteints d'immunosuppression induite par le sepsis. De plus, nous avons validé une technique de mesure par cytométrie de flux de mHLA-DR au lit du malade sur des faibles volumes de sang frais. Nous avons ensuite décrit les phénotypes myéloïdes et leurs rôles dans l'immunosuppression chez une série de cas graves de patients atteints de pneumopathie à COVID-19 se compliquant de sepsis bactérien. Enfin, nous avons réalisé une étude sur les biomarqueurs immunologiques d'infections associées aux soins chez des patients pédiatriques transplantés du foie, dont une partie des expériences et les analyses sont encore en cours.

Title: Role and function of the major histocompatibility complex class II transactivator (CIITA) in bacterial sepsis

Keywords: CIITA, mHLA-DR, IFN- γ , sepsis, immunosuppression

Abstract: Sepsis remains a major cause of death worldwide. The immune system plays a central role in the response to infection. The initial state of inflammation, triggered by the innate immune response, can progress to uncontrolled self-amplification and organ failure. At the same time, in order to control it, a negative anti-inflammatory response is established which can lead to a state of immunosuppression, resulting in secondary infections and mortality in intensive care. This state is characterised by a quantitative and qualitative deficit in the immune response. Monocyte expression of HLA-DR (mHLA-DR), a MHC class II molecule presenting antigen to T cells, is a relevant marker of the sepsis-induced immunosuppression state to date. Its expression is regulated primarily by the class II transactivator, CIITA, which is transcriptionally controlled by a highly conserved region located in the promoter. The identification of genetic polymorphisms, or SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), in this promoter region that have been implicated in inflammatory diseases, as well as evidence of positive selection in the 5' region, allowed us to target the SNP G-286A*rs3087456.

In the first part of our work, we demonstrated the role of the SNP in the decrease of *CIITA* promoter III activity, the recovery of *CIITA* promoter III activity after IFN- γ stimulation, and its role in the mortality of patients in septic shock in relation to the decrease of mHLA-DR.

In the following, we presented safety and efficacy data of IFN- γ treatment in patients with sepsis-induced immunosuppression. In addition, we validated a flow cytometric technique for measuring mHLA-DR at the patient's bedside on small volumes of fresh blood. We then described the myeloid phenotypes and their role in immunosuppression in a severe case series of patients with COVID-19 pneumonia complicated by bacterial sepsis. Finally, we conducted a study on immunological biomarkers of healthcare-associated infections in paediatric liver transplant patients, for which some of the experiments and analyses are still ongoing.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je souhaiterais remercier :

Monsieur le Pr Pierre TISSIERES pour m'avoir dirigé, soutenu et poussé pendant toutes ces années. Merci pour toutes ces nombreuses heures de travail consacrées à cette thèse. Tu as su me transmettre le goût de la recherche, valable jour et nuit, week-ends et vacances inclus. Travailler au sein de ton équipe médicale, ainsi que celle du laboratoire, est un véritable privilège. Merci enfin pour ton amitié et ta générosité, allant jusqu'à m'aider à aller expérimenter la vie dans ta magnifique Suisse natale.

Les membres du jury :

Monsieur le Dr Bernard MAILLERE, merci d'avoir accepté de présider cette thèse. Merci de votre soutien sincère durant ces années au sein de l'école doctorale.

Madame la Dr Nuala MOONEY, merci d'avoir accepté de juger ce travail et de m'avoir rassuré et soutenu depuis le comité de mi-thèse.

Monsieur le Pr Karim ASEHNOUNE, merci d'avoir accepté de juger ce travail. C'est un honneur d'avoir au sein de mon jury un expert de l'interaction hôte-pathogène, anesthésiste-réanimateur de surcroît.

Monsieur le Pr Walter REITH, merci d'avoir accepté d'examiner ce travail, c'est un grand honneur d'avoir l'expert international de CIITA pour juger cette thèse.

Madame la Pr Anne-Claire LUKASZEWICZ, merci d'avoir accepté d'examiner ce travail en tant qu'experte du sujet, mais aussi pour ton aide et ta gentillesse.

Monsieur le Dr Michele BONIOTTO, merci d'avoir accepté de juger ce travail, d'avoir eu la patience d'encadrer mes premiers pas au laboratoire et de m'avoir expliqué sans relâche le pourquoi du comment. Ta passion pour la science, sans limite de temps (ne pas partir le soir sans avoir de résultats, commencer les expériences à l'aube, recevoir des articles tard dans la nuit etc.) est un modèle pour tout chercheur. Merci enfin pour ton amitié, ton humour et ta gentillesse depuis toutes ces années.

Monsieur le Pr Didier PAYEN, merci de votre soutien, de votre bienveillance et de vos encouragements permanents. Travailler et apprendre à vos côtés est un privilège et un honneur.

Je tiens à remercier l'équipe de recherche « Host Pathogen Interactions in Human Sepsis » de l'I2BC, et plus particulièrement le Dr Luis AUGUSTO, pour son encadrement, sa gentillesse et sa bonne humeur permanente. Merci à Wahid, Stéphanie et Sem. Merci à mes collègues de médecine, Clémence, Nada, Caroline,

Simon, qui sont venu faire vivre le laboratoire grâce à leurs travaux de recherche, leurs dynamismes, leurs sympathies et leurs rires.

Merci à l'ancienne équipe de l'unité INSERM 1012, Kim et Stéphane, pour leur aide scientifique alors que je ne connaissais rien, les moments de détente et leurs amitiés.

Merci à l'incroyable équipe de soignants de la réanimation pédiatrique et néonatale de Bicêtre de m'avoir laissé du temps pour me consacrer à ce projet : Philippe (mon maître), Mostafa, Claire et Denis, pour leurs savoirs et leurs bienveillances. Merci aussi, sans limite ni retenue, à Nolwenn et Zied, votre amitié au quotidien, votre expérience et vos fous rires dans notre bureau me manquent déjà. Merci à tous les autres médecins (Ramy, Vladimir, Luc, Diane, Laure, Ikram, Narjess, Quitterie, Mélissa et j'en oublie), et soignants (l'équipe des marmites et des « jeunes »). Vous êtes formidables.

Merci aux « amis de la semaine » et « du week-end » d'être toujours là, à qui je répète depuis toutes ces années « je serai plus disponible quand j'aurai fini ma thèse ».

A mes grands-parents, et encore plus à Yaya, qui, malgré une vie de labeur dès le plus jeune âge, réfugiée espagnole fuyant les troupes franquistes à pied avec ses parents, nous a toujours tout donné et qui est si fière de nous.

A mes parents pour m'avoir transmis la valeur du travail et l'importance de la réussite à l'école. Merci de votre aide et amour constant. A ma sœur, Maïlys, pour son soutien, son humour et de m'avoir fait relativiser beaucoup de choses.

A Hanna, l'amour de ma vie, vie qui continuera d'être pleines de superbes aventures (dont la dernière est en cours actuellement). Merci aussi pour ta relecture, tes corrections, et encore plus de me porter et supporter au quotidien.

A Julia, ce petit miracle d'humour et de malice, qui a 5 ans maintenant, là pour me rappeler à l'ordre quand il faut aller jouer, apprendre à faire du vélo sans petites roues, l'emmener à l'école de temps en temps et manger plus souvent ensemble le soir au lieu d'être à l'hôpital. Je t'adore ma fille !

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
ABBREVIATIONS ET ACRONYMES	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
INTRODUCTION	13
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	15
1 <i>Sepsis et choc septique.....</i>	15
1.1 Épidémiologie et définition du sepsis	15
1.2 Facteurs de risque.....	15
1.3 Prise en charge thérapeutique	16
2 <i>Sepsis et réponse immunitaire de l'hôte.....</i>	17
2.1 Physiopathologie de l'inflammation sévère.....	18
2.1.1 Phase précoce et reconnaissance microbienne.....	18
2.1.2 Cascade immuno-inflammatoire.....	23
2.1.3 Immunosuppression liée au sepsis	26
2.2 Altération immunitaire liée au sepsis en réanimation	31
2.2.1 Cellules effectrices circulantes de l'immunité innée	31
2.2.1.1 Les monocytes	31
2.2.1.2 Les polynucléaires neutrophiles	35
2.2.1.3 Cellules dendritiques.....	36
2.2.2 Organes lymphoïdes	36
2.2.3 Lymphocytes.....	38
2.3 Prise en charge de l'immunosuppression liée au sepsis	41
2.4 Biomarqueurs	44
3 <i>MHC Class II transactivator : CIITA.....</i>	45
3.1 Identification de CIITA, le régulateur principal de l'expression du CMH-II.....	46
3.2 CIITA, un membre fondateur des protéines NLR	47
3.3 Éléments régulateurs situés dans le promoteur du CMH-II.....	49
3.4 Régulation de l'expression du gène CIITA	51
3.5 Rôle du polymorphisme du promoteur III dans le développement de maladies inflammatoires.....	54
3.6 Sélection positive dans la région 5'.....	55
4 <i>Conclusion</i>	56
TRAVAUX DE RECHERCHE.....	59
1 <i>Présentation du projet de thèse.....</i>	59
2 <i>Polymorphisme génétique du promoteur de CIITA et altération de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes chez les patients en choc septique.....</i>	62
2.1 Contexte	62
2.2 Description de l'étude.....	62
2.3 Résultats et conclusion.....	63

3	<i>Validation de la mesure de l'expression de mHLA-DR par cytométrie de flux sans lyse ni lavage au chevet du patient avec un faible volume de sang total</i>	80
3.1	Contexte	80
3.2	Description de l'étude.....	80
3.3	Résultats et conclusion.....	80
DISCUSSION		99
1	<i>Polymorphismes de CIITA : rôle et régulation d'une protéine indispensable à l'expression du CMH de classe II</i>	100
1.1	Polymorphismes et réponse au sepsis : cas particulier des SNP de CIITA.....	101
1.2	Effet du polymorphisme G-286A*rs3087456 de CIITA sur la régulation de l'expression de mHLA-DR.....	102
2	<i>Altération de la réponse myéloïde à l'infection : exemple du COVID-19 (travail présenté dans les annexes)</i>	108
2.1	HLA-DR monocytaire et infection sévère à COVID-19	109
2.2	Phénotype myéloïde d'activation macrophagique.....	110
2.3	Description des populations myéloïdes en lien avec l'infection sévère à COVID-19.....	111
3	<i>Thérapie immunomodulatrice par IFN-γ dans l'immunosuppression liée au sepsis (travail présenté dans les annexes)</i>	112
3.1	Effet des thérapeutiques immunomodulatrices dans la restauration de la réponse immunitaire impliquant mHLA-DR et/ou CIITA	112
3.2	Données cliniques et de sécurité	114
3.3	Données immunologiques	115
4	<i>Perspectives</i>	116
CONCLUSION		120
ANNEXES		122
1	<i>Expérience multicentrique de traitement par IFN-γ dans l'immunosuppression induite par le sepsis : une série de cas</i>	122
1.1	Contexte	122
1.2	Description de l'étude.....	122
1.3	Résultats et conclusion.....	122
2	<i>Les phénotypes myéloïdes dans les cas graves de COVID-19 prédisent l'apparition d'infection secondaire et la mortalité : une étude pilote</i>	135
2.1	Contexte	135
2.2	Description de l'étude.....	135
2.3	Résultats et conclusion.....	135
3	<i>Le projet SEPTIFOIE : un protocole pour l'étude des biomarqueurs des infections associées aux soins et de l'immunodépression chez les enfants après transplantation hépatique</i>	147
3.1	Contexte	147
3.2	Description de l'étude.....	147
3.3	Résultats et conclusion.....	148
REFERENCES		189

ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
BGN	Bacille Gram Négatif
BLS	Bare Lymphocyte Syndrome
CIITA	Class II TransActivator
CD	cellules dendritiques
CRP	Protéine-C-Réactive
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
CREB	Cyclic-AMP-Responsive-Element-Binding protein
DAMP	Danger Associated Molecular Patterns
FDA	Food and Drug Administration
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HAMM	HyperActivated Monocytes/Macrophage
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSP	Heat Shock Protein
HSV	Herpes Simplex Virus
HHV	Herpes Human Virus
IL	Interleukine
IFN- γ	Interféron- γ
IRAK	Interleukin- receptor-associated kinase
LPS	Lippolysaccharide
MD-2	Myeloid differentiation factor-2
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cell
MFI	Mean Fluorescence Intensity
mTOR	mechanistic Target Of Rifampicin
NLR	Nod Like Receptors
NLS	Nuclear Localisation Signal
Proteins NLR	Nucleotide-binding and Leucine-rich-Repeat-containing
NO	Monoxyde d'azote
NOD	Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins
ODN	OligoDeoxyNucléotides
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCT	Procalcitonine
PD	Programmed cell Death
PD-L1	Programmed cell Death Ligand 1
PMN	PolyMorphonuclear cells
PNN	Polynucléaires Neutrophiles
PRR	Pattern Recognition Receptor
RFX	Regulation Factor X
ROS	Reactive Oxygen Species
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score II
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu
SNP	Single Nucleotide Peptide
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment

sTREM-1	soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1
TLR	Toll Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
VIH	Virus de l'Immunodéficience Acquise

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Reconnaissance des PAMPs par les TLR de surface cellulaire, d'après Kawai et al. (Kawai and Akira 2010).	20
Figure 2 : Reconnaissance des PAMPs par les TLR intracellulaires, d'après Kawai et al. (Kawai and Akira 2010).	21
Figure 3 : Agonistes endogènes des TLRs et maladies immunitaires, d'après Kawai et al. (Kawai and Akira 2010).	23
Figure 4 : Cinétique des cytokines dans le sepsis, d'après Steeland et al. (Steeland, Libert and Vandenbroucke 2018).....	25
Figure 5 : Modèles caractéristiques de changement dans les concentrations plasmatiques de certaines protéines de la phase aiguë après un stimulus inflammatoire modéré, d'après Gabay et al. (Gabay and Kushner 1999).	26
Figure 6 : Théories concurrentes de la réponse immunitaire de l'hôte dans le sepsis, d'après Hotchkiss et al. (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a).	28
Figure 7 : Altération des fonctions immunitaires innées après un sepsis, d'après Venet et al. (Venet and Monneret 2018).	38
Figure 8 : Altération des fonctions immunitaires adaptatives après un sepsis, d'après Venet et al. (Venet and Monneret 2018).	40
Figure 9 : Immunopathogénie du sepsis et interventions immunomodulatrices, d'après (van der Poll, Shankar-Hari and Wiersinga 2021).	43
Figure 10 : Structure du domaine des protéines de liaison aux nucléotides et de répétition de leucine (NLR) CIITA (a), NLRC5 (b) et NLRP3 (c), d'après Leon Machado et al. (León Machado and Steimle 2021).	47
Figure 11 : Le régulateur principal du CMH-II, CIITA, et l'enhanceosome, d'après Leon Machado et al. (León Machado and Steimle 2021)	51
Figure 12 : Structure modulaire de la région régulatrice du gène codant pour CIITA, d'après Reith et al. (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).	53
Figure 13 : Régulation de l'expression de CIITA, d'après Reith et al. (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).	54
Figure 14 : Score d'haplotype intégré (iHs : integrated haplotype score) dans la population européenne, d'après Vasseur et al. (Vasseur et al. 2012).	55
Figure 15 : Valeurs Fst extrêmes de CIITA, d'après Vasseur et al. (Vasseur et al. 2012).	56
Figure 16 : Schéma de l'architecture 3-D du locus de CIITA avec utilisation différentielle des promoteurs, d'après Lohsen et al. (Lohsen et al. 2014)	104
Figure 17 : Événements distaux dépendants de BRG1 à CIITA, d'après Ni et al. (Ni et al. 2008).	106
Figure 18 : Exemple d'un mécanisme moléculaire proposé pour la régulation des gènes MOR (« μ opiod receptor ») par le remodelage de la chromatine, d'après Hwang et al. (Hwang et al. 2010).	107

Figure 19 : Localisation d'HLA-DR chez les monocytes perméabilisés par
microscopie confocale à immunofluorescence, d'après Fumeaux et al. (Fumeaux
and Pugin 2002). 119

INTRODUCTION

Le sepsis est encore responsable de nos jours d'une morbidité et mortalité importantes à travers le monde, malgré une amélioration constante des prises en charge basées sur des recommandations internationales (Evans *et al.* 2021). Sa physiopathologie repose sur l'interaction de systèmes complexes, le système immunitaire y jouant un rôle déterminant (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a). A la phase initiale du sepsis, la réponse physiologique à l'infection entraîne la libération d'une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de l'immunité innée. Cette inflammation peut s'auto-amplifier de façon incontrôlée et conduire à un état d'hyper-inflammation pouvant aller jusqu'aux défaillances d'organes. Parallèlement, pour contrôler l'inflammation, des mécanismes de régulation négative se mettent en place. Ceux-ci peuvent parfois évoluer vers un état d'immunosuppression favorisant l'apparition d'infections secondaires, ou encore de décès tardifs. Cet état d'immunosuppression se caractérise sur le plan immunologique par un déficit quantitatif, avec une diminution du nombre de cellules immunitaires circulantes, mais aussi qualitatif, avec des altérations fonctionnelles et phénotypiques touchant aussi bien les cellules de la réponse immunitaire innée qu'adaptative (Venet and Monneret 2018). Cette réponse immunitaire dérégulée est actuellement considérée comme un paradigme dans la pathogenèse du sepsis et est reconnue comme une composante importante du pronostic (Venet and Monneret 2018).

Dans ce contexte, l'altération de la capacité de présentation de l'antigène aux lymphocytes T est constante (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a). L'expression quantitative d'HLA-DR, molécule du CMH de classe II permettant la présentation de l'antigène, à la surface des monocytes circulants est largement reconnue comme un marqueur de l'immunodépression induite par le sepsis, lorsque celle-ci est diminuée (Lukaszewicz *et al.* 2009; Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a; Conway Morris *et al.* 2018).

Parmi les gènes étudiés dans la régulation de l'expression des molécules du CMH de classe II, *CIITA*, le transactivateur de classe II, en est le régulateur principal (Pachot *et al.* 2005b). L'expression de *CIITA* est quant à elle contrôlée principalement au niveau transcriptionnel par un module de régulation hautement conservé qui se situe dans la région promotrice du gène. Une fois

traduite, la protéine CIITA, associée à un complexe multiprotéique, permet d'activer la transcription des gènes du CMH de classe II (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).

Dans les années 2000, un polymorphisme génétique situé dans le promoteur III de *CIITA* (SNP G-286A*rs3087456) a été identifié comme associé à l'apparition de maladie inflammatoire dans la population du nord de l'Europe (Swanberg *et al.* 2005; Bronson, Criswell and Barcellos 2008; Bronson *et al.* 2011; Eike *et al.* 2012). De plus, des preuves d'une sélection positive de la région génomique 5' de *CIITA* ont été détectées et semblent cibler le G-286A*rs3087456 ou un haplotype qui le contient (Vasseur *et al.* 2012).

Les travaux présentés ici s'articulent autour de la compréhension des mécanismes de régulation de *CIITA* à partir de polymorphismes génétiques situés dans sa région promotrice, et plus précisément le SNP G-286A*rs3087456, situé sur le promoteur III de *CIITA*, et son rôle dans l'altération de l'expression d'HLA-DR monocyttaire chez les adultes atteints de choc septique.

Sur le plan thérapeutique, la compréhension de ces mécanismes physiopathologiques pourrait permettre de développer des thérapies immuno-adjuvantes ciblées, comme l'interféron- γ (IFN- γ) qui gagne récemment en intérêt, et dont le but est d'inverser l'immunosuppression induite par le sepsis (Payen *et al.* 2019; Nguyen *et al.* 2021). Nous présenterons ici une expérience multicentrique sur le traitement par IFN- γ d'une série de cas de patients atteint d'immunosuppression induite par le sepsis.

Afin d'élargir l'accès au monitoring immunologique rapide, et à partir d'un faible volume sanguin, nous avons mis au point et validé une technique de mesure adaptée aux patients de pédiatrie de mHLA-DR au lit du malade dans une unité de soins intensifs.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'apparition de sepsis au sein de deux groupes de patients : les cas graves de COVID-19 via les phénotypes myéloïdes et leur rôle dans l'immunosuppression ; les transplantés hépatiques pédiatriques et les biomarqueurs immunologiques d'infections associées aux soins.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1 Sepsis et choc septique

1.1 Épidémiologie et définition du sepsis

Le sepsis a été reconnu en 2017 par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une priorité mondiale de santé (Reinhart *et al.* 2017). D'après des données extrapolées, on estime que le sepsis serait responsable d'environ 30 millions de cas et de 6 millions de morts par an dans le monde (Fleischmann *et al.* 2016).

L'incidence du sepsis est élevée et en constante augmentation du fait du vieillissement de la population, de l'immunodépression et de l'émergence des bactéries multi-résistantes (Kumar *et al.* 2011). En ce qui concerne les formes graves de sepsis, l'incidence atteignait 1000 cas pour 100 000 habitants aux États-Unis en 2009 (Gaieski *et al.* 2013) et le nombre estimé d'hospitalisations pour sepsis sévère représentaient 2% dans les pays à haut revenu (Martin 2012), allant jusqu'à 10% en 2015 dans une série nord-américaine (Meyer *et al.* 2018).

La définition du sepsis a évolué récemment, abandonnant, entre autres, le concept de syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) devant le manque de spécificité et sensibilité dans le diagnostic de sepsis sévère (Cohen *et al.* 2004; Sprung *et al.* 2006; Singer *et al.* 2016). Le sepsis est désormais largement reconnu comme une dysfonction d'organe secondaire à une réponse inappropriée de l'hôte à l'infection, concomitant d'un état d'immunodépression transitoire ou persistant (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a; Singer *et al.* 2016). De cette nouvelle définition découle les stratégies de prise en charge visant à contrôler la réponse de l'hôte (Evans *et al.* 2021).

1.2 Facteurs de risque

Parmi les principaux facteurs de risque de sepsis, l'âge est l'un des plus importants. Du fait d'un système immunitaire soit immature soit sénescence, les âges extrêmes de la vie sont les plus exposés. En pédiatrie, ce risque est encore plus important chez la population la plus jeune, notamment en néonatalogie (Bahl *et al.* 2009; Wiens *et al.* 2012). Chez les personnes âgées, s'ajoute à un système immunitaire sénescence, les pathologies chroniques responsables de comorbidités occasionnant une mortalité liée au sepsis plus élevée (Angus *et al.* 2001; Martin, Mannino and Moss 2006; Yang *et al.* 2010). Les maladies altérant le système immunitaire comme le diabète, ou encore les pathologies tumorales malignes, majorent aussi le risque de sepsis ainsi que sa gravité (Danai *et al.* 2006; Koh *et al.* 2012).

L'influence de l'origine ethnique est plus discutée. Elle est probablement multifactorielle et fait intervenir des facteurs génétiques mais aussi des facteurs environnementaux, sociaux et économiques (Vogel 2012). Certaines maladies génétiques altèrent les cellules du système immunitaire comme le déficit immunitaire combiné sévère, groupe de maladies héréditaires rares caractérisées par une anomalie des lymphocytes T et/ou B. Sans traitement, ces patients développent des infections sévères et fatales avant l'âge de deux ans. D'autre part, de plus en plus de polymorphismes génétiques intéressants différentes étapes de la réponse immunitaire à l'infection ont été décrits, comme pour Toll-like receptor 4 (TLR4) (Colín-Castro *et al.* 2021), Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1 et IRAK4) et MyD88 (von Bernuth *et al.* 2008; Carrasco-Colom *et al.* 2015), protéines intervenant dans la reconnaissance du pathogène et les voies de signalisation. Ils sont rapportés aussi pour certaines molécules de co-stimulation exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène comme CD86 (Wang, Gui and Zhang 2015), ou encore pour les protéines de l'inflammation, comme IL-6 (Hu *et al.* 2019), IL-10 (Schaaf *et al.* 2003) ou TNF- α (Georgescu *et al.* 2020), ces polymorphismes pouvant affecter les profils d'expression des gènes, la structure et la production des protéines (Stuber *et al.* 2005).

1.3 Prise en charge thérapeutique

Des recommandations internationales, éditées dans le cadre d'une campagne de sensibilisation et d'homogénéisation des pratiques pour traiter le sepsis,

encadrent la prise en charge à partir de recommandations gradées (Evans *et al.* 2021). Celles-ci reposent principalement sur l'administration précoce d'une antibiothérapie probabiliste à large spectre (Kumar *et al.* 2006), une expansion volémique rapide de 30 ml/kg d'un soluté cristalloïde et l'administration de drogues vasopressives. Bien que la prise en charge du sepsis soit standardisée, les traitements immunomodulateurs spécifiques, tels que les stéroïdes à forte dose (Minnecci *et al.* 2009), les anti-endotoxines (Ziegler *et al.* 1991), les inhibiteurs des cytokines pro-inflammatoires IL-1, TNF- α , IL-6 (Eichacker *et al.* 2002; Shakoory *et al.* 2016) et les anticoagulants tels que la protéine C activée (Warren *et al.* 2002; Abraham *et al.* 2005) ont montré des résultats équivoques chez les patients atteints de sepsis (Suffredini and Munford 2011; Fang *et al.* 2019). Malgré cela, des analyses post-hoc ont montré des avantages (ou des inconvénients) spécifiques dans des groupes de patients lorsqu'ils sont stratifiés en fonction du phénotype immunologique ou du profil transcriptomique (Shakoory *et al.* 2016; Antcliffe *et al.* 2019; Kernan *et al.* 2019), ce qui suggère un rôle pour les traitements immunomodulateurs personnalisés dans le sepsis.

2 Sepsis et réponse immunitaire de l'hôte

Malgré des efforts considérables pour promouvoir la reconnaissance et le traitement précoce du sepsis, plusieurs millions d'individus dans le monde développent chaque année des dysfonctions sévères d'organes liées au sepsis, requérant des thérapeutiques de réanimation lourdes et conduisant fréquemment à une morbi-mortalité importante. En effet, l'antibiothérapie précoce et le traitement des défaillances d'organes ne permettent pas actuellement de renverser le pronostic. Récemment, des équipes de recherche se sont intéressées à la persistance d'un état critique chez ces patients permettant d'en améliorer la compréhension (Angus and Opal 2016).

Au fur et à mesure des années, les théories supportant l'hypothèse que la mortalité dans le sepsis était liée à une réponse immunitaire innée pro-active, hyper-inflammatoire, responsable de l'atteinte multiviscérale, ont laissé place à celle plus complexe d'une dysfonction du système immunitaire inné et adaptatif expliquant la morbi- mortalité du sepsis. De façon plus précise, la découverte qu'un patient en sepsis puisse être plus à risque d'infections secondaires ou

encore avoir une réponse immunitaire moindre aux infections, via par exemple une diminution de l'expression des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des monocytes, a permis d'avancer l'hypothèse que le système immunitaire puisse devenir hypoactif et présenter une immunodépression (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a).

2.1 Physiopathologie de l'inflammation sévère

Une fois le pathogène reconnu par l'organisme, la réponse innée du système immunitaire se met en place, complétée secondairement par la réponse adaptative, plus spécifique.

Cette réponse inflammatoire initiale, nécessaire à la défense de l'hôte contre l'infection, est caractérisée par une phase pro-inflammatoire, pouvant s'auto-entretenir et s'amplifier d'elle-même. Son intensité et sa réponse dérégulée sont responsables des dysfonctions d'organes précoces et de la mortalité immédiate. L'étude de la réponse immunitaire chez les patients de réanimation a mis en évidence que celle-ci s'affaiblissait rapidement permettant ainsi de diminuer les conséquences d'une inflammation persistante et de limiter son extension aux autres organes. Cependant, la persistance d'une altération de la réponse immunitaire innée expose les patients aux infections et aux dysfonctions d'organes secondaires, et donc à un risque de mortalité tardive.

2.1.1 Phase précoce et reconnaissance microbienne

Les différents agents pathogènes, bactéries, virus, champignons ou parasites, possèdent des structures moléculaires conservées, sélectionnées au cours de l'évolution afin de permettre au pathogène de survivre et d'interagir avec leur environnement. Ces motifs, non retrouvés chez l'hôte, sont communs à de nombreux pathogènes, appelés PAMPs (« Pathogen Associated Molecular Patterns »). Parmi ceux-ci, l'exemple le plus connu sont les LPS (lipopolysaccharides), composants principaux de la paroi externe des BGN (bacilles Gram négatif).

L'hôte est capable de reconnaître ces motifs grâce à une famille de récepteurs nommés PRRs (« Pattern Recognition Receptors ») et ainsi d'activer la réponse immunitaire (cf. Figure 1) (Kawai and Akira 2010; van der Poll, Shankar-Hari and Wiersinga 2021).

Les Toll-like receptors (TLRs) sont les PRRs les plus étudiés. Ils sont exprimés par les cellules immunitaires participant à la réponse innée (monocytes, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques) mais aussi par les cellules épithéliales, notamment au point d'entrée des pathogènes dans l'organisme. Plusieurs TLRs différents existent chez l'homme et permettent grâce à leur localisation diverse dans la cellule, de reconnaître les pathogènes extra- ou intra-cellulaire. Les TLRs détectent des structures extrêmement variées, par exemple TLR4 et LPS, et en fonction du pathogène, activent des voies de signalisation intracellulaire différentes (Akira and Takeda 2004; Liew *et al.* 2005). L'activation de ces voies permet la synthèse de médiateurs clés dans la réponse inflammatoire, notamment IL-1 β et TNF α , ou encore des interférons de type I. Elle permet aussi l'expression de molécules de co-stimulation à la surface cellulaire, la libération des radicaux libres (oxygénés et nitrés) et des peptides antimicrobiens qui participent à l'élimination du pathogène.

Le rôle des TLRs est central dans la pathogenèse du sepsis. Des défauts dans les gènes codant pour les TLRs ou pour les protéines de signalisation intra-cellulaire sont associés à une susceptibilité accrue aux infections bactériennes (Ku *et al.* 2007). De plus, leur expression est fortement augmentée dans le sepsis (Tsujiimoto *et al.* 2005). Un antagoniste de MD-2 : TLR-4, MD-2 étant le co-récepteur de TLR-4, l'eritoran, a été proposé comme cible thérapeutique potentielle dans le sepsis. Eritoran, un analogue synthétique du lipide A et un antagoniste puissant et spécifique de l'action du LPS, inhibe la liaison du lipide A à MD2 et met fin à la signalisation médiée par MD2/TLR4 in-vitro, ex-vivo et in-vivo. Ayant montré des résultats prometteurs en phase II d'un essai thérapeutique (Tidswell *et al.* 2010), l'essai de phase III n'a pas montré de différence sur la mortalité à 28 jours entre le groupe traité et le groupe placebo (28,1 % vs 26,9 %, P=0,59, HR 1,05 ; 95 % IC 0,88-1,26) (Opal *et al.* 2013). Autre exemple d'essai concernant les thérapeutiques anti-inflammatoires dans le sepsis : la protéine C activée. Une étude randomisée chez les patients en choc septique n'a pas montré de différence entre le traitement et le placebo sur la mortalité à J28 (26,4 % vs 24,2 %, RR 1,09, IC 95 % 0,92-1,28, P=0,31) (Ranieri *et al.* 2012). D'autres traitements anti-inflammatoires seront

exposés dans le paragraphe 2.3 (Prise en charge de l'immunosuppression liée au sepsis).

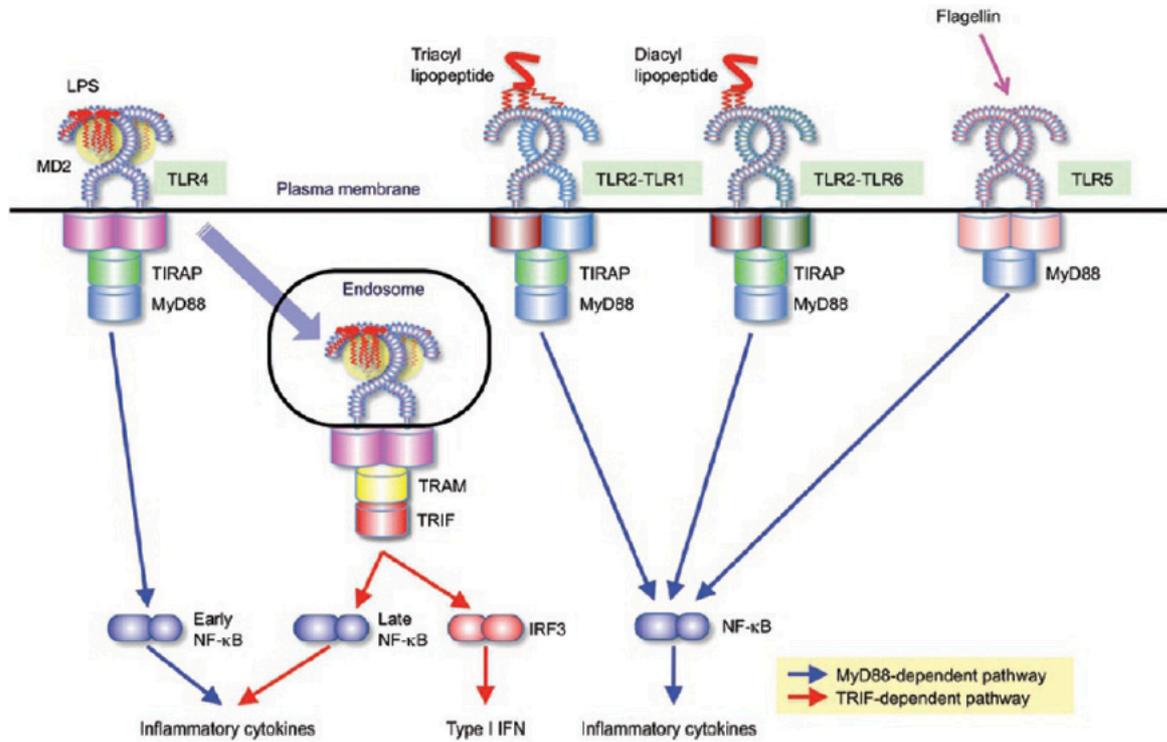


Figure 1 : Reconnaissance des PAMPs par les TLR de surface cellulaire, d'après Kawai et al. (Kawai and Akira 2010).

TLR4 en interaction avec MD2 se lie au LPS. Cinq des six chaînes lipidiques du LPS se lient à MD2 et la chaîne lipidique restante s'associe à TLR4. La formation d'un récepteur multimérique composé de deux copies du complexe TLR4-MD2-LPS transmet initialement des signaux pour l'activation en phase précoce de NF-κB en recrutant le « TIR domain-containing adaptators TIRAP » (Mal) et MyD88 (voie dépendante de MyD88). Le complexe TLR4-MD2-LPS est ensuite internalisé et retenu dans l'endosome, où il déclenche la transduction du signal en recrutant TRAM et TRIF, ce qui conduit à l'activation d'IRF3 et de NF-κB en phase tardive pour l'induction de l'interféron de type I (voie dépendante de TRIF). L'activation du NF-κB en phases précoce et tardive est nécessaire pour l'induction des cytokines inflammatoires. Les hétérodimères TLR2-TLR1 et TLR2-TLR6 reconnaissent respectivement les lipopeptides triacylés et diacylés. Deux des trois chaînes lipidiques du lipopeptide triacylaté interagissent avec TLR2, et la troisième chaîne se lie au canal hydrophobe de TLR1 (absent de TLR6). TLR2-TLR1 et TLR2-TLR6 induisent l'activation de NF-κB par le recrutement de TIRAP et MyD88. TLR5 reconnaît la flagelline et active NF-κB par l'intermédiaire de MyD88.

D'autres récepteurs sont eux localisés en intracellulaire, la famille des Nod Like Receptors (NLR), et reconnaissent des fragments bactériens afin d'activer des cytokines comme l'IL-1 β (cf. Figure 2) (Rathinam, Vanaja and Fitzgerald 2012). D'autres encore reconnaissent les motifs ARN étrangers au soi, réponse antivirale, ou encore d'autres interviennent dans la réponse antifongique.

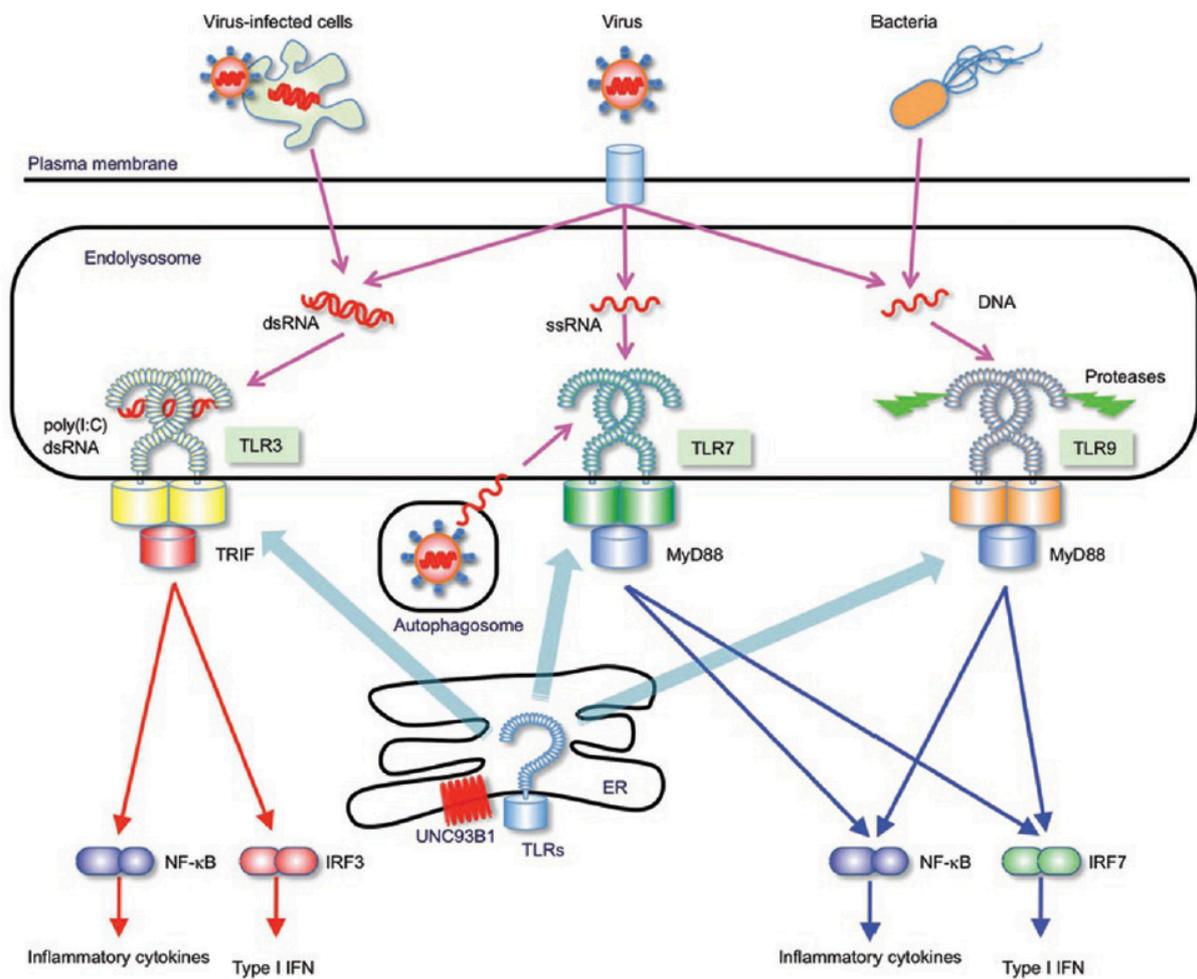


Figure 2 : Reconnaissance des PAMPs par les TLR intracellulaires, d'après Kawai et al. (Kawai and Akira 2010).

TLR3 reconnaît les ARNdb (db : double brin) dérivés de virus ou de cellules infectées par des virus ; les ARNdb se lient aux sites N- et C-terminaux sur le côté latéral de la surface convexe de l'ectodomaine de TLR3, ce qui facilite la formation d'un homodimère via la région C-terminale. TLR3 active la voie TRIF-dépendante pour induire l'interféron de type I et les cytokines inflammatoires. Dans les pDCs (cellules dendritiques plasmiques), TLR7 reconnaît les ARNsb (sb : simple brin) dérivés de virus à ARNsb dans les endolysosomes et active NF- κ B et IRF7 via MyD88 pour induire des cytokines inflammatoires et l'interféron de type I, respectivement. De plus, l'autophagie est impliquée dans le transport de l'ARNsb aux vésicules exprimant TLR7. TLR9 reconnaît l'ADN dérivé des virus à ADN et des bactéries. Le clivage protéolytique de TLR9 par les protéases cellulaires est nécessaire pour la transduction du signal en aval.

TLR9 recrute MyD88 pour activer NF- κ B et IRF7 dans les pDCs. TLR3, TLR7 et TLR9 se localisent principalement dans le RE (réticulum endoplasmique) à l'état stable et circulent vers les endolysosomes, où ils s'engagent avec leurs ligands. UNC93B1 interagit avec ces TLR dans le RE et est essentiel pour ce trafic.

Les PRRs peuvent aussi être activés par les DAMPs (« Danger Associated Molecular Patterns »), signaux dangers libérés en cas d'atteinte tissulaire, lors de la nécrose ou de l'apoptose cellulaire (cf. Figure 3). Par exemple, les HSP (« Heat Shock Protein ») dont le rôle permet de favoriser le repliement des protéines, une fois libérées dans les tissus, peuvent initier un processus inflammatoire et la reconstruction cellulaire. Autre exemple, l'ADN mitochondrial, qui fait partie du groupe de DAMPs mitochondriaux, est libéré par les cellules endommagées ou au cours de la mort cellulaire, et est reconnu par TLR9 en raison des motifs CpG hypométhylés codés, réminiscence d'une origine bactérienne ancestrale (Zhang *et al.* 2010). Il a été démontré précédemment que les niveaux d'ADN mitochondrial sont élevés dans le plasma des patients qui développent un SDRA (syndrome de détresse respiratoire aigu) et une défaillance d'organe au cours du sepsis, ainsi qu'au cours d'une lésion aseptique, y compris un traumatisme, un choc hémorragique et une ischémie-reperfusion (Faust *et al.* 2020). La libération d'ADN mitochondrial est souvent accompagnée de la libération d'autres DAMPs, tels que les peptides N-formylés, le cytochrome c et la cardiolipine, qui engagent collectivement de multiples TLR et le récepteur-1 des peptides N-formylés qui, à leur tour, non seulement induisent l'expression de cytokines inflammatoires (Grazioli and Pugin 2018) mais aussi la génération d'espèces réactives de l'oxygène et la facilitation du trafic et de l'activation des neutrophiles (Scozzi *et al.* 2019). Par ces effets, les DAMPs mitochondriaux peuvent contribuer directement aux lésions pulmonaires aiguës et à l'inflammation systémique (Zhang *et al.* 2010).

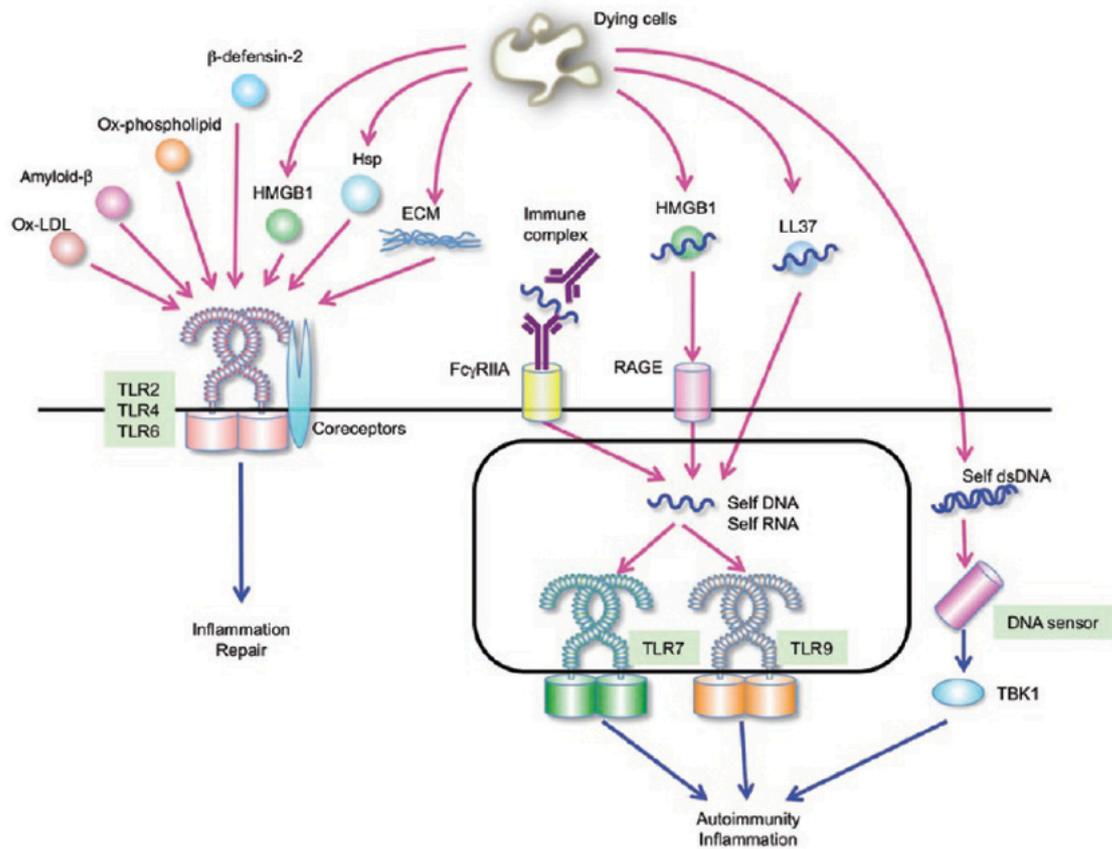


Figure 3 : Agonistes endogènes des TLRs et maladies immunitaires, d'après Kawai et al. (Kawai and Akira 2010).

Les molécules endogènes libérées par les cellules mourantes, telles que HMGB1, les protéines de choc thermique (Hsp) et les composants de la MEC (matrice extra-cellulaire), sont reconnues par TLR2, TLR4 ou TLR2-TLR4. L'amyloïde- β et le LDL oxydé (Ox-LDL) sont tous deux détectés par TLR4-TLR6 avec le corécepteur CD36. Les phospholipides oxydés (Ox-) générés après une infection et le peptide antimicrobien β -défensine 2 sont reconnus par TLR4. La reconnaissance de ces molécules endogènes par les TLR de surface cellulaire entraîne une inflammation ainsi que des réponses de réparation. L'ADN et l'ARN du soi, liés à LL37, sont internalisés dans les endosomes précoces et sont reconnus par TLR9 et TLR7, respectivement. Le complexe HMGB1-ADN propre est internalisé via RAGE et est reconnu par TLR9. Les complexes immunitaires contenant des acides nucléiques du soi sont internalisés via les récepteurs Fc, tels que Fc γ RIIa, et stimulent TLR7 et TLR9. L'ADN du soi incomplètement digéré pendant l'apoptose est probablement détecté par un capteur d'ADN intracellulaire qui active TBK1. La reconnaissance des acides nucléiques du soi par TLR7, TLR9 et un capteur d'ADN non encore défini conduit à l'induction de l'interféron de type I et favorise les maladies auto-immunes et/ou inflammatoires.

2.1.2 Cascade immuno-inflammatoire

Au site de l'infection, lorsque le pathogène est reconnu, le système immunitaire s'active et met en place une réponse inflammatoire localisée dans le but d'éradiquer l'infection. Différents médiateurs sont alors libérés.

Les principales cytokines de la réponse pro-inflammatoire au sepsis sont le TNF α et l'IL-1 (cf. Figure 4). Elles sont augmentées dans le plasma des patients septiques (Bozza *et al.* 2007). Elles permettent le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'infection, ainsi que leurs activations, la synthèse d'IL-6, IL-8, des dérivés oxygénés et du NO. Le NO est d'ailleurs un puissant vaso-dilatateur vasculaire responsable de la vasodilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans le choc septique. L'IL-6, dont le pic de sécrétion chez le patient septique est décalé par rapport à l'IL-1 et au TNF α , peut jouer un rôle inhibiteur et stimuler la sécrétion des médiateurs anti-inflammatoires. L'interleukine-6 est le principal stimulateur de la production de la plupart des protéines de la phase aiguë, par le foie notamment, (protéine C-réactive, sérum amyloïde A, haptoglobine, fibrinogène) induisant une réponse systémique lors du sepsis (cf. Figure 5) (Gabay and Kushner 1999). L'interféron- γ (IFN- γ) est produit par les cellules NK, les lymphocytes Th1 et les lymphocytes T CD8+. Sa sécrétion permet d'amplifier la réponse anti-infectieuse. Il est d'ailleurs retrouvé dans le plasma des patients septiques alors qu'il est indosable chez le patient sain (Calandra *et al.* 1990).

L'ensemble des cytokines synthétisées lors de la réponse pro-inflammatoire agissent de façon synergique et amplifient la réponse en auto-entretenant leur production. De plus, elles permettent le recrutement rapide des nombreuses cellules de la réponse immunitaire (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules dendritiques). Ces cellules présentatrices d'antigènes migrent dans les tissus lymphoïdes et activent les lymphocytes B et T. Les T cytotoxiques éliminent directement le pathogène, les B, via la synthèse d'anticorps, le neutralisent. Ces cellules sont responsables d'un état inflammatoire dans la circulation, qui s'auto-amplifie. En l'absence de régulation négative de ce phénomène, on parle d'orage cytokinique caractérisé par un état d'hyper-inflammation permanent avec sécrétion systémique massive de cytokines. Cette réponse inflammatoire non contrôlée systémique est responsable de l'apparition de défaillances d'organes liée au tableau de choc septique.

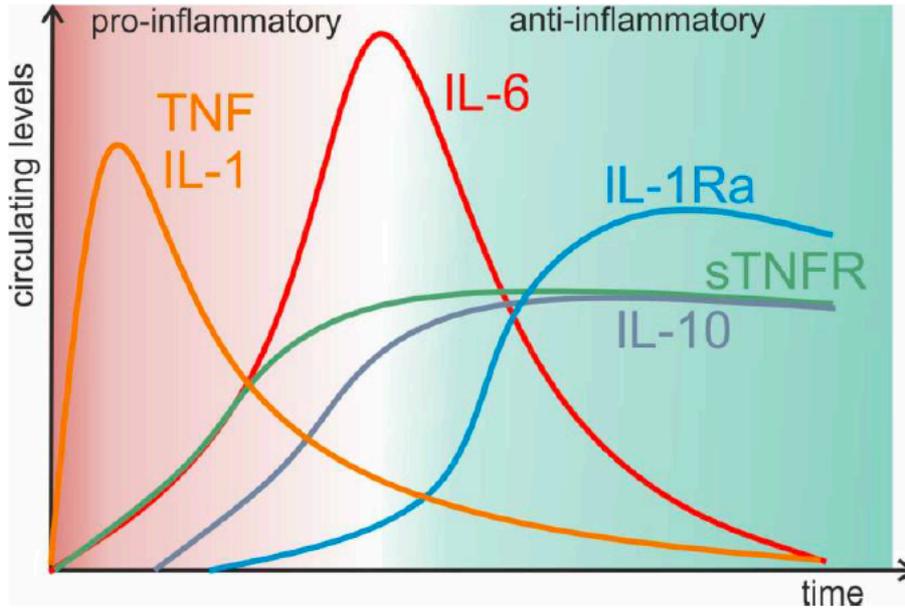


Figure 4 : Cinétique des cytokines dans le sepsis, d'après Steeland et al. (Steeland, Libert and Vandenbroucke 2018).

Le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interleukine (IL-)1 sont les premières cytokines à être libérées dans le sepsis et favorisent la sécrétion de l'IL-6. Ensemble, ces cytokines sont les chefs orchestre de la phase pro-inflammatoire du sepsis. Après un certain temps, des mécanismes de compensation apparaissent pour atténuer la réponse pro-inflammatoire, comme l'IL-10, l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) et le récepteur soluble du TNF (sTNFR).

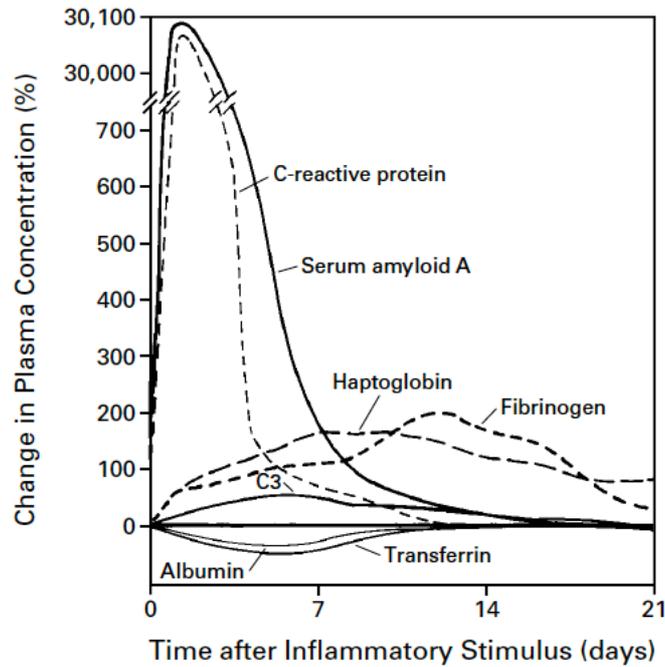


Figure 5 : Modèles caractéristiques de changement dans les concentrations plasmatiques de certaines protéines de la phase aiguë après un stimulus inflammatoire modéré, d'après Gabay et al. (Gabay and Kushner 1999).

2.1.3 Immunosuppression liée au sepsis

L'amélioration de la compréhension physiopathologique a permis la mise en évidence d'un état d'immunosuppression lors du sepsis, caractérisé aussi bien par une altération des cellules du système immunitaire inné, que du système immunitaire adaptatif (Hotchkiss and Karl 2003; Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a). De façon plus précise, l'altération de la fonction immunitaire doit être associée à un risque majoré d'infections, conséquence de l'immunosuppression, pour répondre à la définition de l'immunosuppression, que l'altération immunitaire soit quantitative et/ou qualitative, quel que soit la fonction touchée, et quel qu'en soit la cause (Venet and Monneret 2018). Pour ce qui est de l'immunosuppression après un choc septique, de nombreuses données ont confirmé le surrisque d'infections secondaires après un sepsis, que cela soit un risque majoré d'infections nosocomiales (Landelle *et al.* 2010; Grimaldi *et al.* 2011), de réactivation virale à HSV (Luyt *et al.* 2007) ou à CMV (Limaye *et al.* 2008), d'infections fongiques sévères à levures peu pathogènes (Leroy *et al.* 2009;

Monneret *et al.* 2011), ou la persistance, après plusieurs semaines d'antibiothérapie, de foyers infectieux initialement responsables du choc septique (Torgersen *et al.* 2009). Les données immunologiques montrent aussi une altération quantitative et qualitative des cellules effectrices de l'immunité chez les patients septiques et seront discutées dans le chapitre 2.2 (Altération immunitaire liée au sepsis en réanimation). Pour certains auteurs, cette immunosuppression liée au sepsis correspond à une défaillance d'organe au même titre que les organes comme le cœur, les poumons, le rein etc. (Venet and Monneret 2018).

L'immunosuppression liée au sepsis, transitoire ou non, a été initialement décrite plutôt comme décalée dans le temps. Des travaux montrent que cette phase se déclenche plutôt de manière simultanée et reflète la réponse globale de l'hôte (Novotny *et al.* 2012). Deux hypothèses sont discutées (cf. Figure 6) : l'une suggère que les décès précoces seraient dus à l'importance de l'hyper-inflammation, les décès tardifs étant liés à une réponse anti-inflammatoire prédominante ; l'autre avance que les décès tardifs seraient plutôt dus à une inflammation persistante causant des défaillances d'organe (Xiao *et al.* 2011). Elles ont en commun un échec de retour à l'homéostasie, certains patients ne restaurant jamais leur système immunitaire et évoluant vers un état d'immunosuppression, entraînant ainsi le décès du patient. Ces décès tardifs représentent plus de 70% des décès totaux liés au sepsis, en comparaison avec les décès précoces, confirmant l'hypothèse que des altérations du système immunitaire s'installent et perdurent au cours du temps, sur des durées d'une ou plusieurs semaines (Hotchkiss *et al.* 2009; Delano and Ward 2016; Shankar-Hari and Rubenfeld 2016). Des données récentes d'une série de patient en choc septique montrent, qu'à la sortie de réanimation, 80 % d'entre eux n'avaient pas encore normalisé leur fonction immunitaire (Zorio *et al.* 2017).

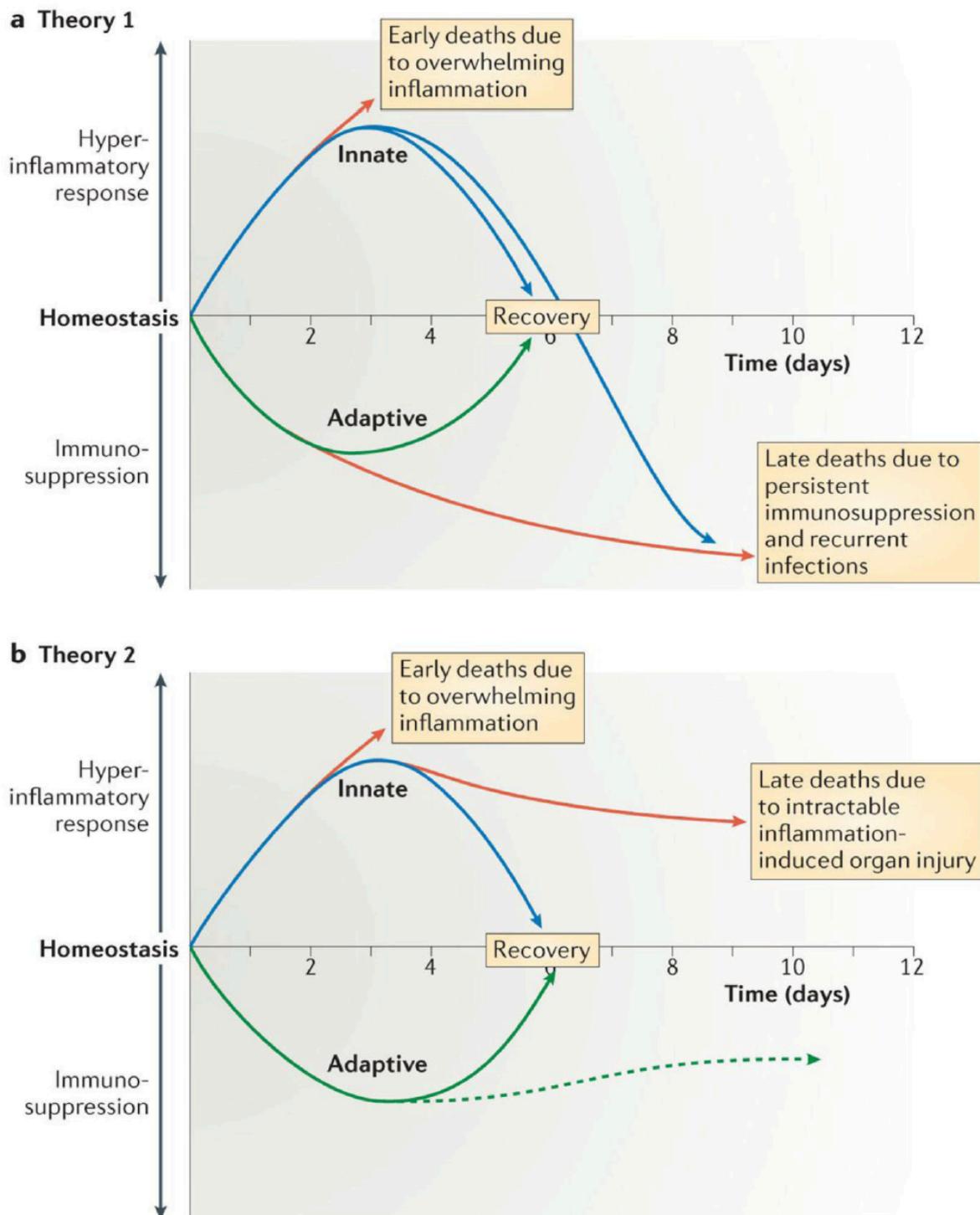


Figure 6 : Théories concurrentes de la réponse immunitaire de l'hôte dans le sepsis, d'après Hotchkiss et al. (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a).

(Théorie n° 1) : Des études récentes montrent que l'activation des réponses immunitaires pro- et anti-inflammatoires se produit rapidement après le début du sepsis. Les cellules du système immunitaire inné, notamment les monocytes et les neutrophiles, libèrent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires qui stimulent l'inflammation (ligne bleue - jours 1-3). L'intensité de la réponse inflammatoire initiale varie d'un patient à l'autre, en fonction de multiples facteurs, dont la charge et la

virulence de l'agent pathogène, les comorbidités du patient et les facteurs génétiques de l'hôte. Les décès précoces en cas de sepsis (ligne rouge supérieure - jour 3) sont généralement dus à une réponse hyperinflammatoire de type "tempête de cytokines" accompagnée de fièvre, de choc réfractaire, d'acidose et d'hypercatabolisme. Un exemple de ce scénario serait un jeune patient mourant du syndrome du choc toxique ou d'une méningococcémie. La plupart des patients voient leur immunité innée et adaptative restaurée et survivent à l'infection (récupération - jour 6). Si le sepsis persiste, la défaillance d'éléments critiques du système immunitaire inné et adaptatif se produit, de sorte que les patients entrent dans un état d'immunosuppression profond (lignes bleue et rouge - après le 6e jour). Les décès sont dus à l'incapacité du patient à éliminer les infections et au développement d'infections secondaires.

(Théorie n° 2) : Une théorie concurrente du sepsis reconnaît qu'il y a une activation précoce de l'immunité innée et une suppression de l'immunité adaptative. Selon cette théorie, les décès dus au sepsis sont dus à une activation persistante de l'immunité innée qui entraîne une inflammation irréductible et des lésions organiques. Selon cette théorie, les décès tardifs dans le sepsis sont dus à une inflammation sous-jacente persistante induite par l'immunité innée.

Les mécanismes responsables de l'immunosuppression liée au sepsis sont nombreux et seront développés dans le chapitre 2.2 (Altération immunitaire liée au sepsis en réanimation). Leur compréhension est indispensable car pouvant servir de cible thérapeutique. Parmi ceux-ci, l'augmentation de l'apoptose des cellules T, B et dendritiques au cours du sepsis entraîne une diminution du nombre de cellules immunitaires circulantes et démontre un effet immunosuppresseur propre des cellules apoptotiques (Hotchkiss and Nicholson 2006).

Les monocytes sont des acteurs clés de la réponse immunitaire. Leur atteinte entraîne une altération de la réponse innée et touche l'ensemble de leurs fonctions : la phagocytose des micro-organismes pathogènes, la présentation de l'antigène aux lymphocytes T via les molécules de CMH-II, et la production de cytokines. HLA-DR est une molécule du CMH-II dont l'expression est diminuée à la surface des monocytes lors des syndromes septiques (Monneret *et al.* 2004; Pachot *et al.* 2005b). Des études ont montré qu'une valeur basse de l'expression monocyttaire d'HLA-DR (mHLA-DR), ou un retour tardif à des valeurs normales, étaient liés à une augmentation de la mortalité (Wu *et al.* 2011) et à l'apparition d'infections secondaires en réanimation (Lukaszewicz *et al.* 2009). L'ensemble de

la littérature suggère le lien entre mHLA-DR et le syndrome septique. Son utilisation paraît utile comme biomarqueur, permettant ainsi le monitoring des patients septiques et sera détaillée chapitre 2.2 (Altération immunitaire liée au sepsis en réanimation).

D'autres récepteurs à la surface des monocytes ont une expression qui varie lors d'un sepsis, par exemple, l'expression de PD-L1 et PD-L2 (« Programmed cell Death Ligand 1 »), récepteurs de co-inhibition, est augmentée. L'augmentation de l'expression de ces derniers à la surface des monocytes serait liée à la gravité du syndrome (score de sévérité) et à la mortalité (Pan *et al.* 2015). Ils joueraient un rôle dans la phase d'immunodépression en inhibant l'activation des lymphocytes T par leur liaison au récepteur PD-1 du lymphocyte T lors des syndromes septiques. Les mécanismes cellulaires plus précis seront développés dans le chapitre 2.2 (Altération immunitaire liée au sepsis en réanimation).

Actuellement, deux grandes incertitudes compliquent la validation de la théorie de l'immunosuppression dans le sepsis. Premièrement, la profondeur de la dysfonction immunitaire ainsi que le type d'atteinte de celle-ci n'est probablement pas uniforme au cours du temps ou entre les individus. Deuxièmement, le fait que l'immunosuppression dans le sepsis conduise à favoriser les infections secondaires, responsables de la morbi-mortalité dans le sepsis, n'est pas bien démontré (Angus and Opal 2016).

Un travail récent dans le cadre du projet MARS (« Molecular Diagnosis and Risk Stratification of Sepsis ») a mis en évidence ces limites en montrant, sur une large cohorte prospective, que la contribution des infections secondaires jouait probablement modestement dans la morbi-mortalité à court terme (van Vught *et al.* 2016). De plus, l'analyse transcriptomique sur les leucocytes circulants, permettant l'étude du profil de l'expression des gènes impliqués dans la réponse pro- et anti-inflammatoire, n'a pas permis de mettre en évidence un profil typique de l'atteinte liée à l'immunosuppression dans le sepsis. Cela confirme le fait que l'immunosuppression au cours du sepsis n'est pas uniforme et commune à tous les patients.

Récemment, un nouvel axe de recherche a mis en évidence l'importance de la reprogrammation métabolique et épigénétique des cellules de la réponse immunitaire, conduisant à un virage majeur du profil transcriptionnel (Arts *et al.*

2017). L'étude du métabolisme énergétique de la cellule, notamment de la glycolyse, ou encore de son utilisation de l'oxygène, a permis de mettre en avant, entre autre, une diminution de la glycolyse et de la consommation d'oxygène chez les monocytes de patients septiques (Cheng *et al.* 2016). Des voies de signalisation défectueuses impliquant mTOR (« mechanistic Target Of Rifampicin »), kinase intervenant dans la l'homéostasie énergétique de la cellule, peuvent s'orienter vers une restauration sous IFN- γ pour la population monocyttaire, ou sous rhIL-7 (« recombinant human IL-7 ») pour les lymphocytes T (Cheng *et al.* 2016; Venet *et al.* 2017).

2.2 Altération immunitaire liée au sepsis en réanimation

De nombreuses observations ont essayé de caractériser la réponse immunitaire dans le choc septique, au-delà de la réponse inflammatoire initiale. Le but de cette caractérisation est de savoir si les patients septiques sont réellement immunodéprimés en considérant l'ensemble de la réponse immunitaire, qu'elle soit innée ou adaptative.

2.2.1 Cellules effectrices circulantes de l'immunité innée

2.2.1.1 Les monocytes

Les monocytes sont des cellules circulantes dont le rôle dans la réponse immunitaire est central. Ils assurent la phagocytose des micro-organismes pathogènes, la présentation de l'antigène aux lymphocytes T, et produisent des cytokines. Ces fonctions permettent l'activation ciblée des lymphocytes T via la présentation d'un antigène microbien par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, et d'un signal d'activation secondaire via les récepteurs de co-stimulation CD80 et CD86 à la surface du monocyte.

Chez les patients en sepsis, de nombreux travaux montrent une altération phénotypique des monocytes.

L'expression de CD14, co-récepteur au LPS, est altérée chez le patient septique et une diminution du CD14 membranaire serait associée à une augmentation de la mortalité (Brunialti *et al.* 2006; Schaaf *et al.* 2009).

D'autre part, de nombreux travaux ont montré une diminution lors du sepsis de l'expression d'une molécule du CMH-II, nommée HLA-DR (Human Leukocyte Antigen), exprimée à la surface des monocytes (Monneret *et al.* 2004; Pachot *et al.* 2005b; Lukaszewicz *et al.* 2009). Cette perte d'expression des molécules d'HLA-DR à la surface des monocytes (mHLA-DR) après un choc septique serait associée à l'apparition d'infection nosocomiale, les patients qui maintenaient un niveau plus bas d'expression de mHLA-DR, mesuré en MFI (Mean Fluorescence Intensity) par cytométrie de flux, étaient plus à risque de développer une infection secondaire (Landelle *et al.* 2010). De plus, dans ce travail, l'analyse multivariée montrait qu'un niveau de mHLA-DR qui restait bas était associé de façon indépendante avec l'apparition d'une infection nosocomiale après ajustement avec les paramètres cliniques confondants habituels (sexe, score de défaillance d'organe SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) et SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment), durée de cathétérisation et durée d'intubation. Cette perte de fonctionnalité de présentation de l'antigène par les monocytes peut donc expliquer en partie la défaillance immunitaire conduisant au développement d'infections nosocomiales. Avec le même type d'approche, en analyse multivariée, des résultats similaires ont été montrés sur la mortalité : les patients conservant un mHLA-DR bas après un choc septique présentaient de façon indépendante, un surrisque de mortalité (Monneret *et al.* 2006).

De façon intéressante, l'utilisation de mHLA-DR s'est étendue à de nombreuses situations de réanimation. Par exemple, chez le polytraumatisé, les patients qui ne restauraient pas le niveau d'expression de mHLA-DR au cours de leur hospitalisation étaient plus à risque de développer une infection secondaire (Gouel-Chéron *et al.* 2015). Autre exemple, chez des patients grands brûlés, une étude observait une baisse progressive de mHLA-DR au cours de l'hospitalisation, et les patients dont l'expression restait basse faisaient des infections sévères après 15 jours (Venet *et al.* 2007).

L'expression des récepteurs de co-stimulation CD80 et CD86 est aussi modifiée lors du sepsis. Celle-ci diminuait lors du sepsis (Mokart *et al.* 2011) et des polymorphismes génétiques situés sur le gène codant pour CD86 ont été décrits dans la population chinoise, montrant une susceptibilité à développer une infection secondaire à une pneumopathie (Wang, Gui and Zhang 2015).

D'autres molécules co-stimulatrices, négatives cette fois-ci, PD-1 (Programmed cell death 1), et ses ligands PD-L1 et PD-L2 (Programmed cell death ligand), sont impliquées dans un mécanisme d'immunosuppression liée au sepsis qu'est l'épuisement cellulaire T (Day *et al.* 2006; Boomer *et al.* 2011). Cet épuisement consiste en une perte de la fonction effectrice lymphocytaire T, à savoir des capacités de prolifération, de production de cytokines ou d'induction de mort cellulaire par cytotoxicité, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des cellules T (Wherry 2011). Après activation des cellules T, PD-1 est rapidement induit et ensuite exprimé à la surface des cellules T CD4 et CD8, où il interagit avec PD-L1 et PD-L2. PD-L1 est quant à lui largement exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques ou non, et son expression est fortement augmentée lors du sepsis (Sharpe *et al.* 2007). Au cours du sepsis, plusieurs travaux suggèrent un lien entre l'augmentation de l'expression des molécules de la famille de PD-1 et l'état d'immunosuppression. Chez des patients en choc septique, leurs expressions à la surface des monocytes et des lymphocytes CD4 augmentaient, ceci n'étant pas le cas chez les patients polytraumatisés ou volontaires sains. Cette augmentation était de plus associée à la mortalité et à l'apparition d'infections secondaires, mais aussi à une diminution de la prolifération lymphocytaire et de l'augmentation du taux d'IL-10 plasmatique (Guignant *et al.* 2011). Une autre étude plus récente montrait que le niveau d'expression de PD-L1 à la surface des monocytes était corrélé à la mortalité à 28 jours dans le sepsis (Shao *et al.* 2016). Ces travaux suggèrent le rôle immunosuppresseur de l'activation de la voie PD-1/PD-L1 dans le choc septique (cf. aussi paragraphe 2.2.3 Lymphocytes).

Au-delà des altérations phénotypiques, des altérations fonctionnelles des monocytes ont aussi été décrites lors du sepsis.

Des atteintes des capacités de présentation de l'antigène et, de ce fait, d'activation des lymphocytes T ont été avancées. Des travaux ont montré *ex vivo* une diminution des capacités de prolifération T et de production d'IFN- γ après

stimulation des PBMCs au LPS, mais aussi d'une diminution de HLA-DR et CD86 sur les monocytes (Poujol *et al.* 2015). Manjuck *et al.* ont aussi montré la diminution de la réponse proliférative aux stimulations antigéniques de rappel (toxoiide tétanique ou candidine) chez les patients atteints de sepsis en association avec une perte de l'expressions de HLA-DR et CD86 sur les monocytes (Manjuck *et al.* 2000).

La production de cytokines par les monocytes semble être aussi modifiée au cours du sepsis. Des études suggèrent une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires en réponse à une stimulation par LPS (comme TNF α , IL-1 β , IL-6 (Weiss *et al.* 2001; Brunialti *et al.* 2006)) au profit de cytokine anti-inflammatoire (comme IL-10 (Baffari *et al.* 2013)), pourvoyeuse d'un état d'immunosuppression. Une étude récente chez des patients de réanimation montrait que la production de TNF- α intracellulaire, mesurée en cytométrie de flux, était moindre après restimulation des monocytes par du LPS chez les patients après choc septique que chez des contrôles sains (Monneret *et al.* 2017). Ce travail suggère l'hypothèse d'une altération de la fonctionnalité des monocytes après un choc septique, ceux-ci n'étant plus capables de produire des protéines de l'inflammation en cas d'une stimulation par une endotoxine bactérienne.

Peu de données sont disponibles sur l'altération de la fonction phagocytaire, pourtant fonction pivot des monocytes. L'expression de CD64 semble être un marqueur de l'activité phagocytaire. Récepteur de haute affinité au fragment Fc γ de la chaîne lourde des IgG, il est exprimé à l'état basal à la surface des monocytes. Après activation par des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ (Schiff *et al.* 1997)), par liaison des endotoxines au récepteur membranaire CD14 (Pugin *et al.* 1994) ou par opsonisation (via IgG ou protéines du complément (Takano *et al.* 2000)), l'expression de CD64 était augmentée dans les 24 premières heures du choc septique, favorisant ainsi la fonction phagocytaire du monocyte (Danikas *et al.* 2008). L'augmentation de CD64 à la surface à la fois des polynucléaires neutrophiles et des monocytes était d'ailleurs corrélée favorablement avec la survie chez le patient septique (Danikas *et al.* 2008). Malgré une littérature discordante sur la diminution de l'activité phagocytaire du monocyte chez les patients septiques, un travail plus récent montrait que, à moins de 48h du début du sepsis, l'expression membranaire de CD64 à la surface des monocytes était plus élevée chez les survivants que chez les non survivants, et que ce niveau

d'expression diminuait au cours du temps (J7 et J14) chez le patient septique (Ferreira da Mota *et al.* 2018). De façon intéressante, les auteurs montraient aussi une corrélation forte entre l'expression de HLA-DR et CD64 à la surface des monocytes au début du sepsis, les non-survivants présentant principalement une faible expression de mHLA-DR et de CD64 (Ferreira da Mota *et al.* 2018).

2.2.1.2 Les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) participent à la première ligne de défense de l'hôte. En présence d'un signal de danger, ils synthétisent des cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion nécessaires à leur recrutement au niveau du site inflammatoire. Après activation, ils sont capables de phagocyter les micro-organismes pathogènes, de libérer par dégranulation des peptides antimicrobiens, des formes réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species), et mettre en place de la NETose.

Lors de la phase initiale du sepsis, des formes immatures de PNN apparaissent dans la circulation sanguine (Drifte *et al.* 2013). Durant la phase d'immunosuppression, à la fin de la première semaine, des travaux ont montré que la persistance d'une proportion élevée de neutrophiles immatures était associée à la mortalité en réanimation (Demaret *et al.* 2015) et à l'aggravation des patients septiques (Guérin *et al.* 2014). Ces travaux suggèrent aussi une altération des capacités de chimiotactisme, de stress oxydatif et une diminution du contenu en lactoferrine des PNN immatures dans le choc septique (Demaret *et al.* 2015). Ces neutrophiles immatures appartiennent à une nouvelle classe de cellules récemment décrites, notamment en cancérologie, que sont les Myeloid-Derived Suppressor Cell (MDSC), et pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie du choc septique. L'impact clinique de cette lignée a déjà été souligné dans une étude montrant un lien entre l'augmentation du pourcentage des MDSC produisant de l'arginase 1 et la survenue d'infections nosocomiales chez des patients septiques de réanimation, inhibant la prolifération cellulaire T et suggérant le rôle majeur de ces lignées dans l'immunosuppression liée au sepsis (Uhel *et al.* 2017).

2.2.1.3 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules clés dans l'organisation de la réponse immunitaire, au vu de leur rôle dans la présentation de l'antigène. D'après les résultats de Grimaldi *et al.*, après un choc septique, une diminution importante des cellules dendritiques à la fois circulantes (pDC : « plasmacytoid dendritic cells ») et tissulaires (mDC : « myeloid dendritic cells ») était observée comparé au patient sain. Cette déplétion se maintenant dans le temps, la persistance d'un nombre de mDC était associé à la survenue d'infections secondaires en réanimation (Grimaldi *et al.* 2011). Après phagocytose de pathogènes ou après activation par des signaux de danger (DAMPs et PAMPs), les mDC migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent ces antigènes aux cellules de l'immunité adaptative. Une revue générale publiée en 2015 reprenait les notions de diminution du nombre des cellules dendritiques à la phase initiale du sepsis, par apoptose ou par disparition des formes matures via la synthèse prédominante d'IL-10 (Roquilly and Villadangos 2015). Elle reprenait aussi les données connues sur l'altération à long terme des fonctions de ces cellules, notamment de perte de capacité de présentation de l'antigène (Roquilly and Villadangos 2015). Cet état d'immunosuppression, durait plusieurs semaines et rendait impossible une réponse immunitaire efficace.

2.2.2 Organes lymphoïdes

En dehors des cellules circulantes, d'autres organes subissent une altération immunitaire liée au sepsis.

Les organes lymphoïdes primaires (la moelle osseuse et le thymus) sont les lieux de différenciation et de maturation des lymphocytes. La moelle osseuse est aussi le siège de l'hématopoïèse, aboutissant entre autres à la production des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Elle contient donc les précurseurs des cellules circulantes de l'immunité. Des données à partir de biopsie ostéo-médullaire de patients de réanimation montraient, qu'au niveau de la moelle osseuse, une diminution de l'expression de mHLA-DR sur les lignées monocytaires (Faivre,

Lukaszewicz and Payen 2016). En résumant des données connues, on décrit au sein de la moelle osseuse, lors de traumatisme, d'infection, de cancer ou d'inflammation, un blocage de la lignée myéloïde, avec une altération des granulocytes devenant immatures, une diminution du nombre ainsi qu'une altération des fonctions des macrophages et des cellules dendritiques. En compensation, on observe une augmentation des cellules myéloïdes immatures qui possèdent des propriétés immunosuppressives, que l'on nomme les MDSC (Glatman Zaretsky, Engiles and Hunter 2014; Manz and Boettcher 2014). Associés au système nerveux sympathique innervant la moelle osseuse et connus comme jouant un rôle dans la réponse immunitaire, les médiateurs solubles libérés dans la circulation sanguine et qui passent aussi dans la circulation médullaire, modulent la réponse immunitaire dès la genèse de cellules circulantes de l'immunité (Nahrendorf 2018; Venet and Monneret 2018).

Les organes lymphoïdes secondaires sont les lieux d'activation des lymphocytes matures naïfs, et donc le point de départ de la réponse immunitaire adaptative. Un travail analysant les biopsies post-mortem d'organes lymphoïdes secondaires, ici rate et poumon, montrait par exemple que la perte de l'expression de HLA-DR observée dans les cellules circulantes des patients décédés de choc septique, se retrouvait, de façon similaire et parallèle, diminuée à la surface des cellules présentatrices d'antigène et des macrophages tissulaires des organes lymphoïdes (Boomer *et al.* 2011). Ces données avaient aussi été obtenues sur des lavages broncho-alvéolaires de patients polytraumatisés, sans lésion pulmonaire initiale, montrant que ceux dont l'expression d'HLA-DR restait basse sur les macrophages alvéolaires, développaient des infections pulmonaires nosocomiales, une augmentation du taux d'IL-10 dans les lavages étant aussi observée chez ces même patients (Muehlstedt, Lyte and Rodriguez 2002). De la même façon, chez des patients en postopératoire de chirurgie cardiaque, une diminution de mHLA-DR à la surface des macrophages alvéolaires favorisait l'apparition de pneumopathie postopératoire (Chalk *et al.* 2013), allant dans le sens d'une défaillance immunologique systémique apparaissant après une agression.

En résumé, l'ensemble de la lignée myéloïde est affecté par le sepsis : au niveau de la moelle osseuse qui génère globalement des cellules plutôt

immunosuppresseives ; au niveau des cellules circulantes, comme les monocytes qui perdent leur propriété inflammatoire ; au niveau des organes où les macrophages perdent aussi leur propriété et les cellules dendritiques ne sont plus capables de présenter l'antigène (Venet and Monneret 2018) (cf. Figure 7).

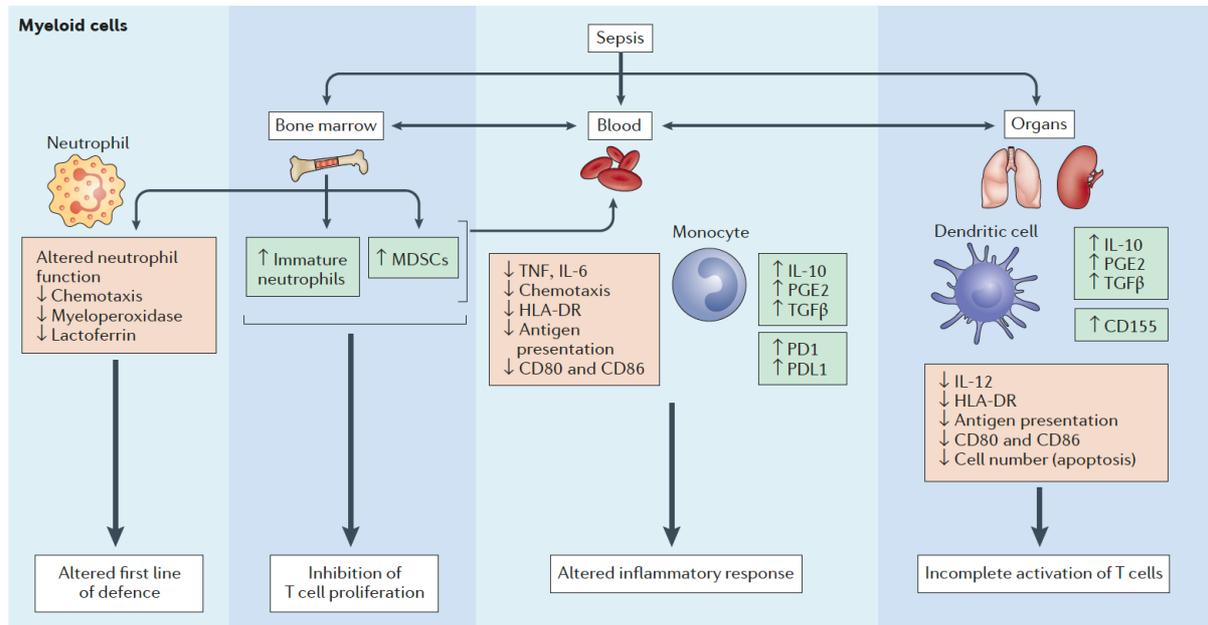


Figure 7 : Altération des fonctions immunitaires innées après un sepsis, d'après Venet et al. (Venet and Monneret 2018).

La réponse immunitaire innée est altérée après un sepsis chez les patients et les souris. Ces altérations immunitaires se produisent non seulement dans le sang mais aussi dans la moelle osseuse et dans des organes éloignés du site initial de l'infection. Ces altérations comprennent une libération accrue de neutrophiles immatures et de cellules suppressives dérivées de la myéloïde (MDSC) à partir de la moelle osseuse, qui s'accompagne également d'altérations des fonctions des neutrophiles matures. Le phénotype et les fonctions des monocytes et/ou des macrophages et des cellules dendritiques sont également altérés et comprennent une diminution des fonctions effectrices, une augmentation de la production de médiateurs anti-inflammatoires et une augmentation de l'expression des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Ces altérations sont délétères pour l'hôte, car elles entraînent une diminution de la réponse de première ligne contre l'infection et une diminution de l'inflammation, ainsi qu'une altération des fonctions des lymphocytes T.

2.2.3 Lymphocytes

Les lymphocytes interviennent dans l'immunité adaptative. Après un choc septique, on observe une lymphopénie profonde. Des auteurs montraient que, dès l'admission, l'ensemble des sous populations lymphocytaires était effondré, y compris les lymphocytes T CD4, et cela persistait dans le temps (Venet and Monneret 2018). D'autres équipes ont confirmé ce résultat, en observant par exemple que l'absence de restauration du compte de lymphocytes T dans la première semaine d'un choc septique était associée à la mortalité (Le Tulzo *et al.* 2002). De plus, l'équipe de Drewry *et al.* avait montré que plus cette lymphopénie était profonde, plus la mortalité était élevée à J28, et que de plus, la lymphopénie profonde mesurée à J4 était associée à la mortalité à 1 an (Drewry *et al.* 2014). Cette lymphopénie semblait favoriser aussi l'apparition d'infections secondaires chez les patients de réanimation (Adrie *et al.* 2017).

Chez les quelques lymphocytes qui persistent après le début du sepsis, une surexpression des molécules PD-1 et PD-L1 était observée et associée soit à la mortalité soit à l'apparition d'infection nosocomiale (Guignant *et al.* 2011). Au niveau des organes lymphoïdes primaires, en l'occurrence le thymus pour les lymphocytes, des données animales basées sur des modèles de sepsis bactérien montraient l'effondrement des thymocytes, précurseurs des lymphocytes T, après un sepsis (Netzer *et al.* 2017) allant jusqu'à l'atrophie du thymus (Kong *et al.* 2016). Cette atrophie thymique entraîne une diminution de la diversité du répertoire T et donc une perte de l'immunosurveillance dans la capacité à détecter un grand nombre de pathogènes. Des données similaires de biologies moléculaires chez le patient en choc septique montraient aussi une perte de clonalité du répertoire lymphocytaire T, indépendamment de la lymphopénie, en comparaison au répertoire de sujets sains. De plus, cette diminution de la diversité du répertoire de cellules T était corrélée très fortement à la mortalité ($p = 0,0058$; HR = 4,48 ; 95% IC 1,96-53,32) et au développement d'infections nosocomiales ($p < 0,05$) (Venet *et al.* 2013a).

Au total, et de façon très succincte, chez les patients septiques, et quel que soit le type de lymphocytes, leur nombre absolu diminue. On observe aussi une diminution des fonctions effectrices au profit d'une augmentation des fonctions régulatrices ou suppressives via les molécules PD-1 et PD-L1 (Venet and Monneret 2018) (cf. Figure 8).

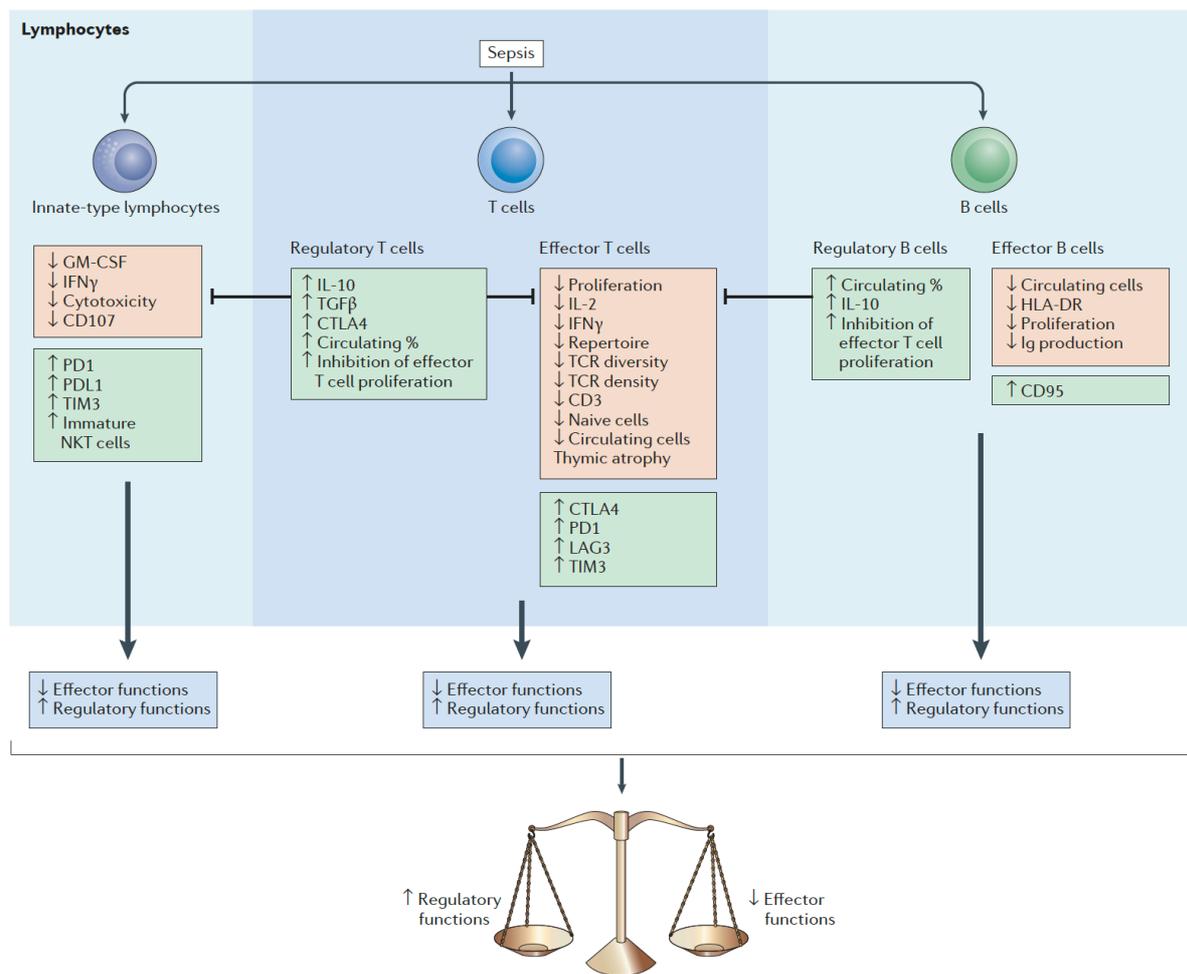


Figure 8 : Altération des fonctions immunitaires adaptatives après un sepsis, d'après Venet et al. (Venet and Monneret 2018).

La réponse immunitaire adaptative est altérée après un sepsis chez les patients et chez les souris. Le sepsis affecte les fonctions effectrices et les phénotypes des cellules T, des cellules B et des lymphocytes de type inné, tels que les cellules tueuses naturelles (NK). La cytotoxicité des cellules NK, la production d'IFN γ par les lymphocytes T et la prolifération cellulaire des lymphocytes B sont réduites, tandis que l'expression des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire est augmentée dans les cellules NK et les lymphocytes T. Les proportions de cellules T et de cellules B épuisées et régulatrices sont élevées après un sepsis, alors que ces types cellulaires jouent un rôle majeur dans la régulation des fonctions des lymphocytes effecteurs. CTLA4, cytotoxic T lymphocyte protein 4 ; HLA DR, HLA class II histocompatibility DR ; Ig, immunoglobuline ; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; LAG3, lymphocyte activation gene 3 protein ; NKT, natural killer T ; PD1, protéine de mort cellulaire programmée 1 ; PDL1, ligand 1 de mort cellulaire programmée ; TCR, récepteur de cellules T ; TGF β , facteur de croissance transformant β ; TIM3, récepteur de mucine d'immunoglobuline de cellule T 3.

2.3 Prise en charge de l'immunosuppression liée au sepsis

A la phase initiale du choc septique, les 2 ou 3 premiers jours, l'immunosuppression est un processus physiologique adaptatif qui permet, chez tous les patients de limiter les dégâts liés à la réponse inflammatoire (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a). Dans un second temps, le système immunitaire des patients septiques évolue soit favorablement vers un retour à l'homéostasie, soit, chez certains patients, vers un processus pathologique mal adaptatif d'immunosuppression (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a). Il semble donc difficile de prévenir cet état d'immunosuppression.

Pour lutter contre la phase hyper-inflammatoire du sepsis, de nombreux essais thérapeutiques utilisant des molécules anti-inflammatoires ont été conduits mais se sont révélés négatifs. Cependant, la lecture rétrospective de ces essais a permis de mettre en évidence l'efficacité de ces thérapeutiques, comme les traitements par antagoniste du récepteur à l'IL-1 (Shakoory *et al.* 2016) ou l'anti-TNF (Panacek *et al.* 2004), notamment dans les sous-groupes de patients les plus graves. Les discussions actuelles s'orientent vers l'identification des patients pouvant bénéficier de ces traitements, leur délai et leur durée d'administration, ainsi que le relai avec des thérapeutiques immuno-stimulatrices (Venet and Monneret 2018).

Le concept d'immuno-stimulation s'applique à la phase d'immunosuppression liée au sepsis. Le but est d'améliorer la réponse immunitaire pour favoriser l'élimination du foyer infectieux et lutter contre les infections secondaires. En effet, l'action de l'antibiothérapie à elle seule, dans la défense anti-infectieuse, n'est pas suffisante pour garantir une élimination complète des bactéries chez les patients immunosupprimés. L'emploi de molécules immunostimulantes provoque une restauration du système immunitaire qui, associée à l'antibiothérapie, permet une élimination définitive du pathogène.

Plusieurs stratégies ont déjà été évaluées, quatre molécules ressortent des travaux de ces dernières années (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013b). L'IFN- γ

(interféron- γ) et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) auraient pour cible plutôt la réponse immunitaire innée, tandis que l'IL-7 et PD1/PDL-1 plutôt la réponse adaptative (cf. Figure 9).

L'IFN- γ est produit par les lymphocytes Th-1. Il active les monocytes, augmente la capacité de présentation de l'antigène et de phagocytose et permet la libération de cytokines inflammatoires induites par les LPS. Initialement décrit comme ayant un effet bénéfique dans l'anergie des monocytes lors du sepsis (Döcke *et al.* 1997), son efficacité a été rapportée chez des patients porteurs d'infections sévères (Lukaszewicz *et al.* 2009; Nalos *et al.* 2012) et corrélée à une augmentation de la réponse immunitaire, y compris à celle d'HLA-DR (Venet and Monneret 2018). Malgré ces données préliminaires prometteuses, aucune étude randomisée contrôlée n'a évalué l'IFN- γ . Une étude de phase II randomisée multicentrique internationale a débuté en juillet 2021 visant à inclure 280 patients en choc septique, traités par anakinra (anti-IL-1) en cas d'hyperinflammation (mHLA-DR élevé), par IFN- γ en cas d'immunosuppression (mHLA-DR abaissé) ou placebo (Personalized Immunotherapy in Sepsis (ImmunoSep) ClinicalTrials.gov Identifier : NCT04990232).

Le GM-CSF est un facteur de croissance hématopoïétique. Il stimule la production médullaire des neutrophiles et monocytes, et stimule potentiellement l'activation et la survie des monocytes. Son effet a été étudié, entre autres, chez l'enfant dans le cadre de l'immunosuppression liée au sepsis avec des résultats montrant une restauration de la réponse immunitaire et une diminution des infections nosocomiales (Hall *et al.* 2011). Chez l'adulte, des données prometteuses issues d'une étude contrôlée chez des patients en sepsis montrent que l'administration de GM-CSF guidée par le monitoring de l'immunosuppression par mHLA-DR permettait de restaurer les fonctions immunitaires des monocytes (Meisel *et al.* 2009). Une étude multicentrique française est en cours pour essayer de démontrer l'effet clinique de ce traitement immuno-modulateur, notamment sur l'apparition des infections secondaires en réanimation (NCT02361528).

L'IL-7 est une cytokine indispensable à la croissance, à la différenciation et aux fonctions effectrices des cellules T, et qui régule négativement les lymphocytes Treg. De nombreuses données *ex vivo* sur l'effet immunomodulateur positif de l'IL-7 dans l'immunosuppression liée au sepsis sont à l'origine d'études de phase II, dont un travail récent montrant une restauration du nombre de lymphocytes chez des patients immunosupprimés en choc septique (Francois *et al.* 2018).

PD1 (Programmed cell Death protein 1) et les récepteurs du système PD1 constituent une voie potentielle de contrôle de l'immuno-régulation. Bloquer l'interaction entre PD1 et ses ligands, PDL1 et PDL2, permet d'inhiber le contrôle négatif de la réponse immunitaire au niveau des lymphocytes T. Ces anticorps ciblant le système PD1 sont utilisés en cancérologie et ont fait progresser les prises en charge (Dyck and Mills 2017). Chez les patients septiques, certains auteurs ont observé une relation entre l'expression de molécules liées au système PD1 et la dysfonction du système immunitaire liée au sepsis comme la prolifération lymphocytaire, et la mortalité ou les infections secondaires liées au sepsis (Chang *et al.* 2014; Patera *et al.* 2016). Une étude de phase II randomisée contre placebo montre que le traitement par anti-PDL-1 restaure les fonctions immunitaires chez 20 patients septiques immunosupprimés (Hotchkiss *et al.* 2019a). De la même façon, des données issues d'une étude de phase II sur l'anti-PD-1 donnent des résultats prometteurs sur la restauration accélérée du statut immunitaire (Hotchkiss *et al.* 2019b).

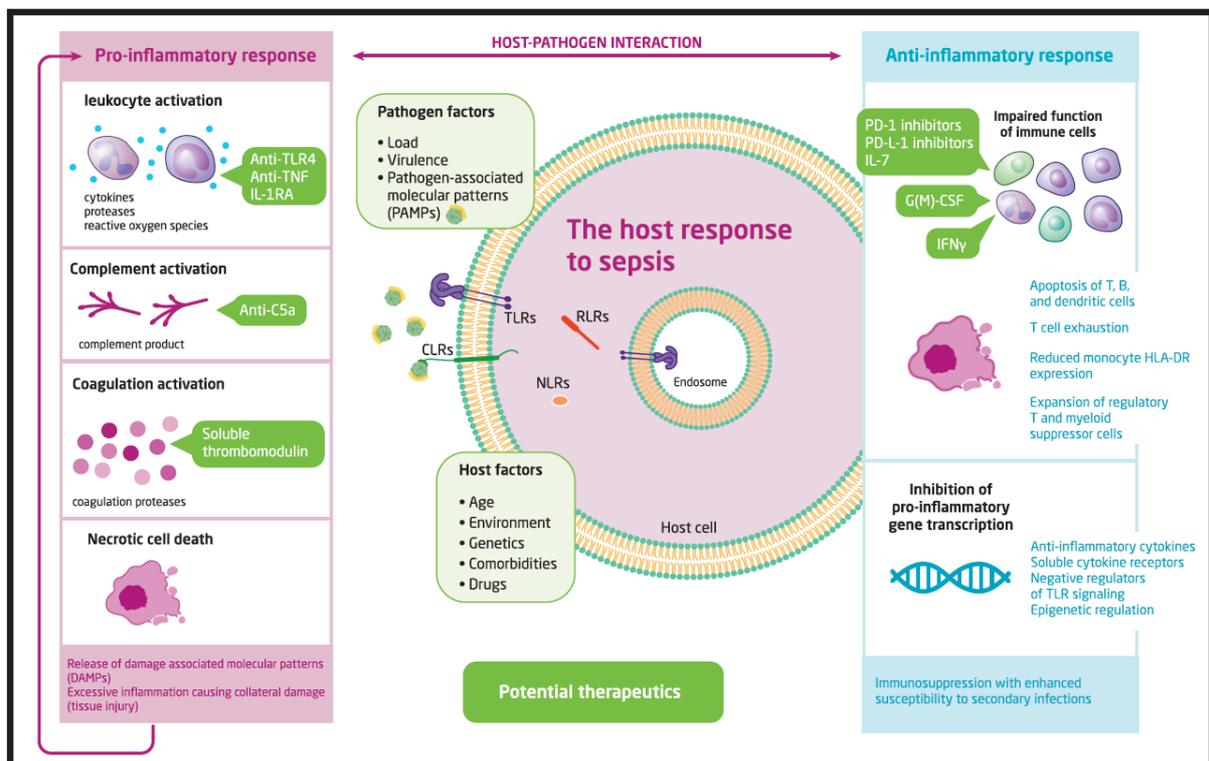


Figure 9 : Immunopathogénie du sepsis et interventions immunomodulatrices, d'après (van der Poll, Shankar-Hari and Wiersinga 2021).

La réponse de l'hôte au sepsis commence par la reconnaissance d'un agent pathogène par le système immunitaire. Les récepteurs de reconnaissance de la surface cellulaire et des formes intracellulaires, tels que les récepteurs de type Toll (TLR), les récepteurs de type domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides (NLR), les récepteurs de type lectine C (CLR) et les récepteurs de type gène inductible par l'acide rétinolique (RLR) reconnaissent les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs), puis la réponse inflammatoire est déclenchée. L'ampleur de la réponse immunitaire individuelle dépend de l'agent pathogène (par exemple : la charge microbienne et la virulence) et des facteurs de l'hôte (par exemple : l'âge, la génétique, les comorbidités et les médicaments). Une réponse dérégulée de l'hôte peut contribuer à la défaillance des organes et à la mort. La réponse pro-inflammatoire se caractérise par la libération de médiateurs pro-inflammatoires (tels que les cytokines, les protéases et les dérivés réactifs de l'oxygène) par de multiples types de cellules, l'activation du système du complément, du système de coagulation et de l'endothélium vasculaire. Il peut en résulter la libération d'alarmines ou de motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) qui peuvent exacerber la réponse pro-inflammatoire et contribuer aux lésions tissulaires. La réponse anti-inflammatoire est caractérisée par une altération de la fonction des cellules immunitaires (par exemple : apoptose des lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules dendritiques, épuisement des lymphocytes T, expansion des lymphocytes T régulateurs et des cellules immunosuppressives dérivées des cellules myéloïdes, et réduction de l'expression de l'isotype HLA-DR (human leukocyte antigen) par les cellules présentatrices d'antigènes) et une diminution de la capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires, qui est en partie régulée par des mécanismes épigénétiques, la libération de cytokines anti-inflammatoires et des régulateurs négatifs de la signalisation TLR. Les cases vertes indiquent une sélection d'interventions qui ciblent spécifiquement différentes étapes de la réponse inflammatoire dans le sepsis, allant des agents bloquant les cytokines et le complément aux médicaments stimulant le système immunitaire tels que les inhibiteurs de points de contrôle.

2.4 Biomarqueurs

Afin de cibler au mieux les patients pouvant bénéficier des thérapies immunomodulatrices, nous avons besoin de biomarqueurs capables d'évaluer le status immunitaire des patients en sepsis. Ces biomarqueurs doivent être notamment capables d'identifier le passage de la phase principalement pro-inflammatoire du sepsis à celle liée à l'immunosuppression profonde. Actuellement, les marqueurs les plus robustes et les plus utilisés dans les études sont le nombre de lymphocytes et l'expression membranaire des molécules du CMH de classe II (HLA-DR) à la surface des monocytes par des techniques de cytométrie de flux (Venet and Monneret 2018). D'autres marqueurs utilisant des techniques de PCR, plus facilement disponibles dans les hôpitaux, sont en cours de validation, comme l'expression des gènes du CMH de classe II dans le sang total

(mRNA de CD74) (Peronnet *et al.* 2017). L'approche thérapeutique via l'immunomonitoring va donc permettre de cibler les patients pouvant en bénéficier, pouvant ainsi faire espérer d'améliorer le traitement des chocs septiques et de prévenir les infections nosocomiales en réanimation.

L'utilisation de biomarqueurs dans le cadre du sepsis a permis à la fois d'améliorer la performance diagnostic et pronostic, mais aussi de guider le clinicien dans sa prise en charge thérapeutique (Evans *et al.* 2021). Beaucoup de biomarqueurs ont été proposés, la procalcitonine (PCT) et la C-réactive protéine (CRP) étant les plus étudiées. Dans une revue récente, Pierrakos *et al.* ont identifié 258 biomarqueurs parmi 5367 études, que cela soit des biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic ou les deux (Pierrakos *et al.* 2020). Cependant, ce travail ne met pas en évidence le rôle clinique de la plupart de ces biomarqueurs dans la prise en charge du sepsis. Afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité des biomarqueurs, de nombreux travaux s'intéressent à la combinaison de biomarqueurs pour le diagnostic du sepsis, comme l'association IL-6, sTREM-1 (soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1) et PCT proposée par Dolin *et al.* (Dolin *et al.* 2018) pour diagnostiquer les sepsis avant le début des symptômes.

3 MHC Class II transactivator : CIITA

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), chez l'homme, antigène leucocytaire humain (HLA), de classe I et de classe II sont des molécules de présentation de l'antigène pour les cellules T CD8+ et CD4+, respectivement, et sont donc d'une importance cruciale pour la réponse immunitaire cellulaire. Les gènes du CMH-II présentent une expression hautement contrôlée en fonction du développement, du type de cellule et du stimulus, avec une expression constitutive limitée aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles telles que les cellules dendritiques (CD), les cellules B, les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales thymiques. Les autres types de cellules ne l'expriment pas ; cependant, l'expression peut être induite dans divers types de cellules par différents stimuli, principalement l'IFN- γ . L'étude d'une immunodéficiência primaire combinée sévère rare autosomique récessive appelée

syndrome des lymphocytes nus (Bare Lymphocyte Syndrome : BLS) (Klein *et al.* 1993) a conduit à l'identification du transactivateur de classe II (CIITA) et des trois gènes codant pour les sous-unités du complexe hétérotrimérique RFX (facteur de régulation X-box) se liant à la boîte X dans le module W/SXY hautement conservé que l'on retrouve dans tous les promoteurs des gènes du CMH-II. Dans cette maladie, les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules épithéliales du thymus n'expriment pas le CMH de classe II, ce qui réduit fortement la sélection positive des lymphocytes T CD4⁺ et altère le nombre de CD4⁺ circulants. En conséquence, les patients souffrent d'infections sévères et récurrentes (infections virales, bactériennes et fongiques) qui conduisent au décès dans la petite enfance. CIITA a été reconnu comme le régulateur principal de l'expression du CMH-II puisque l'expression différentielle des gènes du CMH-II est largement due à l'expression différentielle de CIITA. CIITA est un membre fondateur de la famille des protéines NLR (nucleotide-binding and leucine-rich-repeat-containing), mais pendant longtemps, il s'est distingué dans cette famille de protéines comme le seul régulateur transcriptionnel.

Les gènes du CMH-I, en revanche, sont exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules nucléées ; cependant, leurs niveaux d'expression sont très différents et ils présentent également une expression inductible, par exemple par l'IFN- γ . En plus d'autres éléments régulateurs, le promoteur du gène du CMH-I contient également un élément W/SXY fonctionnel, et CIITA a été décrit comme contribuant à l'activation du CMH-I dans certaines conditions. Cependant, de nombreux types de cellules expriment des niveaux élevés de CMH-I en l'absence totale de CIITA. En effet, l'homologue le plus proche de la CIITA, NLRC5, fonctionne comme un activateur du CMH-I (León Machado and Steimle 2021).

3.1 Identification de CIITA, le régulateur principal de l'expression du CMH-II

CIITA a été identifié par une approche de complémentation génétique dans la lignée de cellules HLA-II négatives RJ2.2.5, dérivée de la lignée de lymphome de Burkitt « Raji » (Accolla 1983; Steimle *et al.* 1993). L'ADNc de 4,5 kb codait pour une protéine de 1130 acides aminés, qui a été identifiée ultérieurement comme l'isoforme III de *CIITA*.

Rapidement après l'identification de CIITA, il a été établi qu'il contrôlait également l'expression du CMH-II induite par l'IFN- γ (Chang *et al.* 1994; Steimle *et al.* 1994). L'ARNm de *CIITA* est induit par l'IFN- γ , et l'expression ectopique de *CIITA* est nécessaire et suffisante pour induire l'expression du gène du CMH-II (Chang *et al.* 1994; Steimle *et al.* 1994). CIITA contrôle quantitativement l'expression du CMH-II et il existe une corrélation étroite entre les niveaux de CIITA et les niveaux d'expression de l'ARNm du CMH-II dans différents tissus (Otten *et al.* 1998).

3.2 CIITA, un membre fondateur des protéines NLR

CIITA est le membre fondateur de la famille des protéines NLR (Ting *et al.* 2008). La structure de la protéine CIITA est caractérisée par un domaine acide N-terminal, une région riche en prolines, sérines et thréonines (domaine P/S/T), un domaine central de liaison aux nucléotides (domaine GTP) et au moins quatre répétitions riches en leucine C-terminales (LRRs). Le domaine de liaison aux nucléotides ont également été décrit comme le domaine NACHT (NAIP, CIITA, HET-E, TP1) et la famille de protéines comme la famille CATERPILLER (caspase activation and recruitment domain (CARD), transcription enhancer, R (purine)-binding, pyrin, lots of leucine repeats) (Koonin and Aravind 2000; Ting and Davis 2005; Ting and Williams 2005).

a) CIITA isoforms



b) NLRC5



c) NLRP3



Figure 10 : Structure du domaine des protéines de liaison aux nucléotides et de répétition de leucine (NLR) CIITA (a), NLRC5 (b) et NLRP3 (c), d'après Leon Machado et al. (León Machado and Steimle 2021).

Abréviations : AAD, domaine d'activation acide ; CARD, domaine d'activation et de recrutement des caspases ; DD, domaine de mort ; F-I, F-III, F-IV, isoformes-I, -III et -IV ; LRR, répétitions riches en leucine ; NACHT, NAIP, CIITA, HET-E, domaine TP1 ; P/S/T, domaine riche en proline-sérine-thréonine ; PYD, domaine de la pyrine.

Trois promoteurs alternatifs (pI, pIII, et pIV) et les exons correspondants génèrent trois isoformes différentes de *CIITA* (isoformes I, III, et IV) se distinguant par leur extrémité N-terminale.

- L'isoforme IV est initiée par un AUG dans l'exon deux commun
- Les isoformes I et III portent leurs propres AUG initiateurs conduisant à des extensions N-terminales de 101 et 24 acides aminés, respectivement. L'extension N-terminale de l'isoforme I présente une homologie avec le domaine d'activation et de recrutement des caspases (CARD).

S'il existe une corrélation étroite entre *CIITA* et l'expression du CMH-II dans de nombreuses lignées cellulaires et tissus, de nombreuses modifications post-traductionnelles ont néanmoins été décrites pour *CIITA*. Ces modifications comprennent la phosphorylation, l'acétylation et la désacétylation, ainsi que l'ubiquitination (Wu *et al.* 2009). En outre, il a été démontré que *CIITA* s'auto-associe à ses domaines GTP et LRR et s'oligomérisent, contribuant ainsi à la localisation nucléaire et à la transactivation (Linhoff *et al.* 2001; Sisk, Roys and Chang 2001; Tosi, Jabrane-Ferrat and Peterlin 2002; Kretsovali *et al.* 2001).

Il n'a jamais été démontré que *CIITA* se liait directement à l'ADN et il a donc souvent été décrit comme un coactivateur. Le domaine acide N-terminal de *CIITA* fonctionne comme un puissant domaine de transactivation et partage de nombreuses fonctionnalités avec le domaine acide de l'activateur viral VP16 (Mahanta *et al.* 1997). *CIITA* active l'initiation et l'allongement de la transcription par de multiples mécanismes (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005; Choi, Majumder and Boss 2011). *CIITA* recrute des composants de la machinerie générale de transcription, tels que TFIID et TFIIB, induit la phosphorylation de l'ARN polymérase II et interagit avec P-TEFb. Il recrute également des coactivateurs du remodelage de la chromatine tels que p300, CBP, PCAF et BRG1 (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005; Choi, Majumder and Boss 2011). *CIITA* interagit également avec la sous-unité

protéasomique 19S, Sug1 (Bhat *et al.* 2010). CIITA possède une activité d'histone acétylase (HAT), une activité kinase endogène et qu'il peut remplacer fonctionnellement le composant TFIID TAF1 (Devaiah and Singer 2013).

Le transport et la localisation nucléo-cytoplasmique de CIITA est un sujet complexe incluant de nombreuses mutations différentes réparties sur toute la longueur de la protéine et affectant la localisation et le transport subcellulaires. Des signaux de localisation nucléaire et des signaux d'exportation nucléaire ont été décrits, ce qui peut expliquer que CIITA à l'état basal présente une distribution à égalité entre le noyau et le cytoplasme (Harton *et al.* 1999; Kretsovali *et al.* 2001; Chiu *et al.* 2015). Plusieurs signaux dépendent de modifications post-traductionnelles, telles que l'acétylation des lysines du domaine acide dépendant de PCAF (Spilianakis, Papamatheakis and Kretsovali 2000). La suppression des domaines acide et P/S/T conduit à un fragment CIITA exclusivement cytoplasmique (L335), qui peut cependant être très efficacement conduit vers une localisation exclusivement nucléaire par l'ajout d'un signal de localisation nucléaire SV40 grand T (NLS-L335). NLS-L335 et L335 sont fortement dominants-négatifs, ce qui suggère que les interactions essentielles avec les partenaires protéiques peuvent se produire à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (Bontron *et al.* 1997; Camacho-Carvajal *et al.* 2004).

CIITA est une protéine à courte durée de vie, l'isoforme III présentant une demi-vie d'environ 30 à 45 minutes (Schnappauf *et al.* 2003; Beaulieu *et al.* 2016). Les signaux de dégradation se trouvent dans les domaines P/S/T et acides de l'extrémité N-terminale, et dans l'extrémité N-terminale elle-même (Schnappauf *et al.* 2003; Beaulieu *et al.* 2016). Les épitope-tags N-terminaux stabilisent la protéine, et les 10 premiers acides aminés de l'isoforme III de CIITA peuvent déstabiliser une protéine hétérologue (Beaulieu *et al.* 2016). Le potentiel de transactivation est inversement corrélé à la stabilité, et l'isoforme III de CIITA interagit plus efficacement avec le complexe RFX et la machinerie de transcription comparativement à la version tronquée (Beaulieu *et al.* 2016).

3.3 Éléments régulateurs situé dans le promoteur du CMH-II

Le promoteur du CMH-II est le prototype d'un élément régulateur composite, souvent appelé module W/SXY ou SXY. Il est composé de quatre éléments en cis, les boîtes W/S, X (ou X1), X2 et Y, qui sont présents dans les promoteurs classiques et non classiques du CMH-II dans un ordre, une orientation et un espacement fixes. L'élément W/S est lié par un facteur encore inconnu, mais les trois autres complexes de liaison ont été bien définis.

- La boîte X est liée par le complexe hétérotrimérique RFX (facteur de régulation X) composé de la sous-unité RFX5 de liaison à l'ADN, de la protéine RFX-AP (protéine associée au RFX) et de la protéine RFX-ANK ou RFX-B (protéine contenant de l'akyrine ou RFX défectueuse dans le groupe B de BLS).
- L'élément X2 est lié à la protéine CREB (cyclic-AMP-responsive-element-binding protein) (Moreno *et al.* 1999).
- La boîte Y, qui est un élément CCAAT inversé, est liée au complexe protéique majeur NF-Y de liaison aux boîtes CCAAT (Dorn *et al.* 1987; Sachini and Papamatheakis 2017).

Ces complexes protéiques se lient de manière coopérative au module W/SXY *in vitro* et *in vivo* et forment une plate-forme à la manière d'un enhanceosome, auquel CIITA est recruté par de multiples interactions protéine-protéine (Masternak *et al.* 2000). Le complexe de liaison W/SXY est inerte en ce qui concerne l'activation du CMH-II *in vivo*, et c'est seulement le recrutement de CIITA au complexe qui est à la fois nécessaire et suffisant pour induire l'expression du CMH-II (cf. Figure 11).

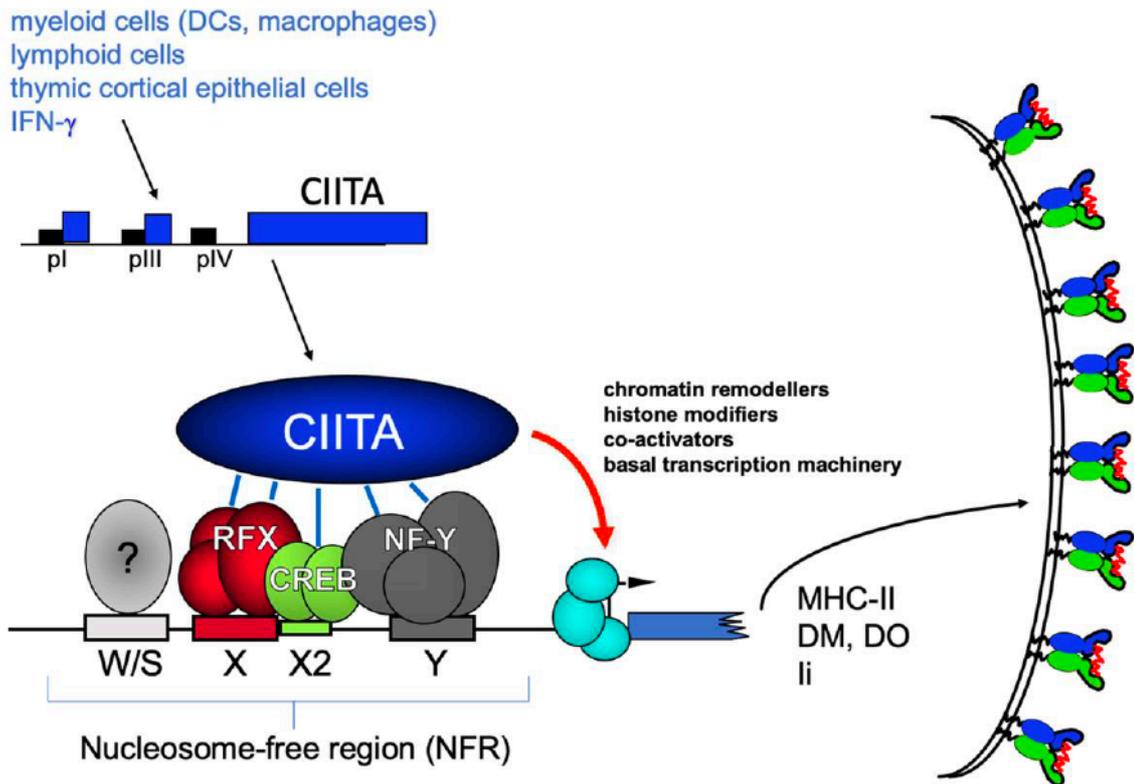


Figure 11 : Le régulateur principal du CMH-II, CIITA, et l'enhanceosome, d'après Leon Machado et al. (León Machado and Steimle 2021)

3.4 Régulation de l'expression du gène CIITA

La régulation de l'expression du gène du CMH-II est en grande partie assurée par CIITA et les niveaux d'expression de l'ARNm du CMH-II et de CIITA sont étroitement corrélés dans divers tissus et lignées cellulaires murines (Otten *et al.* 1998). Ainsi, l'expression différentielle du CMH-II est largement due à l'expression différentielle de CIITA. L'expression de CIITA semble être principalement régulée au niveau de la transcription, bien que diverses modifications post-transcriptionnelles de CIITA aient également été décrites. Les études caractérisant la régulation de l'expression du gène CIITA sont basées sur des études de souris knock-out du promoteur de CIITA (LeibundGut-Landmann *et al.* 2004a; Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005). En résumé :

- Le knock-out du promoteur IV (pIV) de CIITA a montré que ce promoteur était essentiel pour l'expression de CIITA induite par l'IFN- γ dans les cellules

non hématopoïétiques (Waldburger *et al.* 2001). En revanche, il a été démontré que les macrophages présentaient une expression normale de CIITA et du CMH-II induite par l'IFN- γ chez les souris KO pIV (Waldburger *et al.* 2001). Dans les cellules épithéliales corticales thymiques, le pIV est essentiel pour l'expression du CMH-II (Waldburger *et al.* 2003). Par conséquent, les souris CIITA pIV KO présentent un grave défaut de sélection positive des cellules T CD4⁺ (Waldburger *et al.* 2003). Ainsi, CIITA pIV est essentiel pour l'expression de CIITA et du CMH-II dans les cellules d'origine non hématopoïétique (LeibundGut-Landmann *et al.* 2004a; Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).

- Le rôle de l'expression de CIITA pIII a été étudié par le biais de souris KO pIII + IV (LeibundGut-Landmann *et al.* 2004b). Ces souris n'exprimaient pas CIITA et CMH-II dans tous les sous-ensembles de cellules B, ce qui n'est pas le cas des souris KO pIV (LeibundGut-Landmann *et al.* 2004b). En outre, l'expression de CIITA et du CMH-II est absente des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (LeibundGut-Landmann *et al.* 2004b), qui sont probablement d'origine lymphoïde plutôt que des cellules myéloïdes comme les CD conventionnelles (Colonna, Trinchieri and Liu 2004). Contrairement à leurs homologues murins, les cellules T activées humaines expriment CIITA et le CMH-II. Il a été démontré que cette activité est médiée par CIITA pIII (Holling *et al.* 2002), ce qui indique que CIITA pIII est spécifique des cellules d'origine lymphoïde (LeibundGut-Landmann *et al.* 2004a; Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).
- CIITA pI a été décrit à l'origine comme un promoteur spécifique des CD (Muhlethaler-Mottet *et al.* 1997). Il est également utilisé pour l'expression constitutive et inductible par l'IFN- γ de CIITA dans les macrophages et peut donc être considéré comme un promoteur spécifique des cellules myéloïdes (LeibundGut-Landmann *et al.* 2004a; Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005). Les souris dépourvues de CIITA pI et de l'exon 1 correspondant présentaient un phénotype relativement léger (Zinzow-Kramer *et al.* 2012; Lohsen *et al.* 2014). On a constaté que chez les animaux KO pI, l'expression de CIITA dans les CD s'était déplacée principalement vers pIII.

En plus des promoteurs proximaux de CIITA, les éléments régulateurs distaux jouent un rôle crucial dans l'expression de CIITA. De nombreux éléments régulateurs distaux impliqués dans les boucles chromatiniennes ont été identifiés

en amont et en aval du locus du gène *CIITA* (Ni *et al.* 2008). L'enzyme de remodelage de la chromatine BRG1 s'est avérée cruciale pour l'induction de modifications des histones et le recrutement de STAT1, IRF1 et p300 (Ni *et al.* 2008). Plus récemment, il a été démontré que la liaison de NFAT5 à un élément régulateur distal en amont est essentielle pour l'expression de *CIITA*, médiée par l'IFN- γ , chez les macrophages (Buxadé *et al.* 2018).

En résumé, l'expression du gène de *CIITA* est pilotée principalement par une large région régulatrice contenant quatre promoteurs distincts appelés pI, pII, pIII et pIV (cf. Figure 12). Le promoteur II semble agir davantage comme une région régulatrice éloignée et n'a d'ailleurs pas de région homologue dans le gène chez la souris (Ni *et al.* 2008).

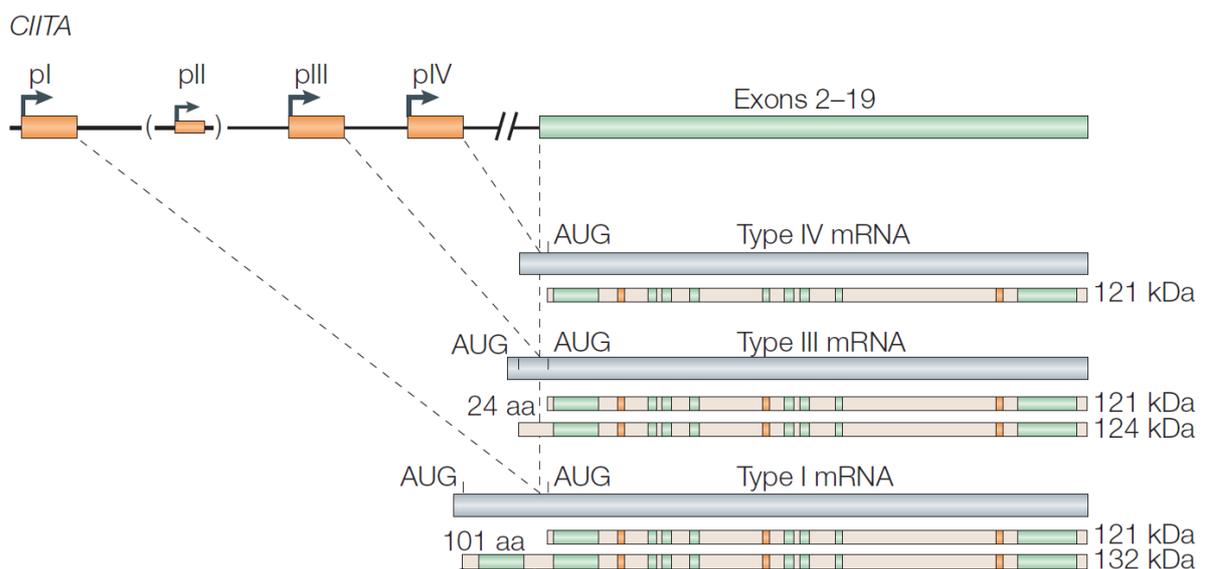


Figure 12 : Structure modulaire de la région régulatrice du gène codant pour *CIITA*, d'après Reith *et al.* (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).

Le promoteur I est principalement utilisé dans les cellules dendritiques. Le promoteur III est hautement spécifique aux cellules B, mais est également le promoteur responsable de la transcription de *CIITA* dans les cellules T activées. Le promoteur IV est le promoteur responsable de l'induction de l'expression du gène *CIITA* par l'IFN- γ . Cette cytokine inflammatoire est un puissant inducteur de l'expression de la protéine du CMH de classe II dans des cellules qui n'expriment pas habituellement le CMH de classe II (cf. Figure 13).

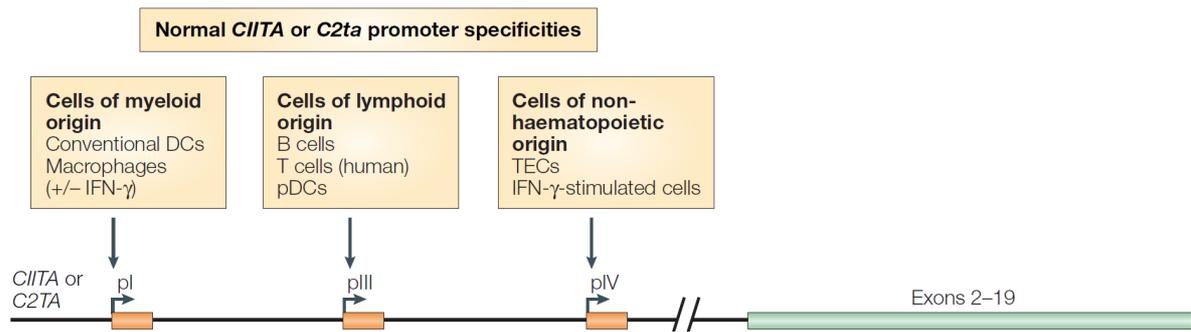


Figure 13 : Régulation de l'expression de *CIITA*, d'après Reith et al. (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).

3.5 Rôle du polymorphisme du promoteur III dans le développement de maladies inflammatoires

Des mutations du gène *CIITA* ont été décrites et sont associées au syndrome des lymphocytes nus et entraînent une mutation récessive caractérisée par une altération de l'expression des gènes du CMH de classe II (Steimle *et al.* 1993; Mach, Steimle and Reith 1994; Dziembowska *et al.* 2002). Parmi les polymorphismes génétiques décrits, le SNP (Single Nucleotide Polymorphism) rs3087456, situé dans le promoteur III de *CIITA*, serait associé à l'apparition de maladies immuno-inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques et à l'infarctus du myocarde dans la population suédoise (Swanberg *et al.* 2005), ou encore de cancers (Xue *et al.* 2020). De plus, Swanberg *et al.* ont montré sur PBMCs que rs3087456 influençait la synthèse des transcrits de *CIITA* et de *HLA-DR* après stimulation par l'IFN- γ (Swanberg *et al.* 2005). D'autres associations de ces SNP avec des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique, la myasthénie grave, la maladie cœliaque et l'insuffisance surrénale primaire ont été publiées (Skinningrud *et al.* 2008; Dema *et al.* 2009; Ramanujam *et al.* 2010; Bronson *et al.* 2011). Cependant, ces associations font l'objet de débats dans la littérature, suggérant une interférence gène-environnement. Bronson *et al.* dans leur méta-analyse ne retrouvaient aucune association significative entre le SNP rs3087456 et la polyarthrite rhumatoïde (Bronson, Criswell and Barcellos 2008), alors qu'une association significative, plus importante dans les cohortes scandinaves, était identifiée dans un autre travail suggérant que la génétique des

populations pouvait jouer un rôle important dans les phénotypes cliniques associés au SNP rs3087456 (Eike *et al.* 2012).

3.6 Sélection positive dans la région 5'

Des travaux de génétique des populations sur les récepteurs de type NOD (« Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins »), ont fourni des preuves d'une sélection positive de la région génomique 5' de *CIITA* (Vasseur *et al.* 2012). La sélection positive, détectée par des tests basés sur le « linkage disequilibrium » et l'indice de fixation ou différenciation (F_{ST} test), semble cibler le SNP rs3087456 qui a été identifié comme hautement différencié en Europe (27% de la population est porteuse du variant G, 73% du A) (cf. Figure 14 et Figure 15). De plus, le SNP rs12596540 serait fortement associé au rs3087456 car en déséquilibre de liaison élevé avec celui-ci ($r^2 > 0,6$).

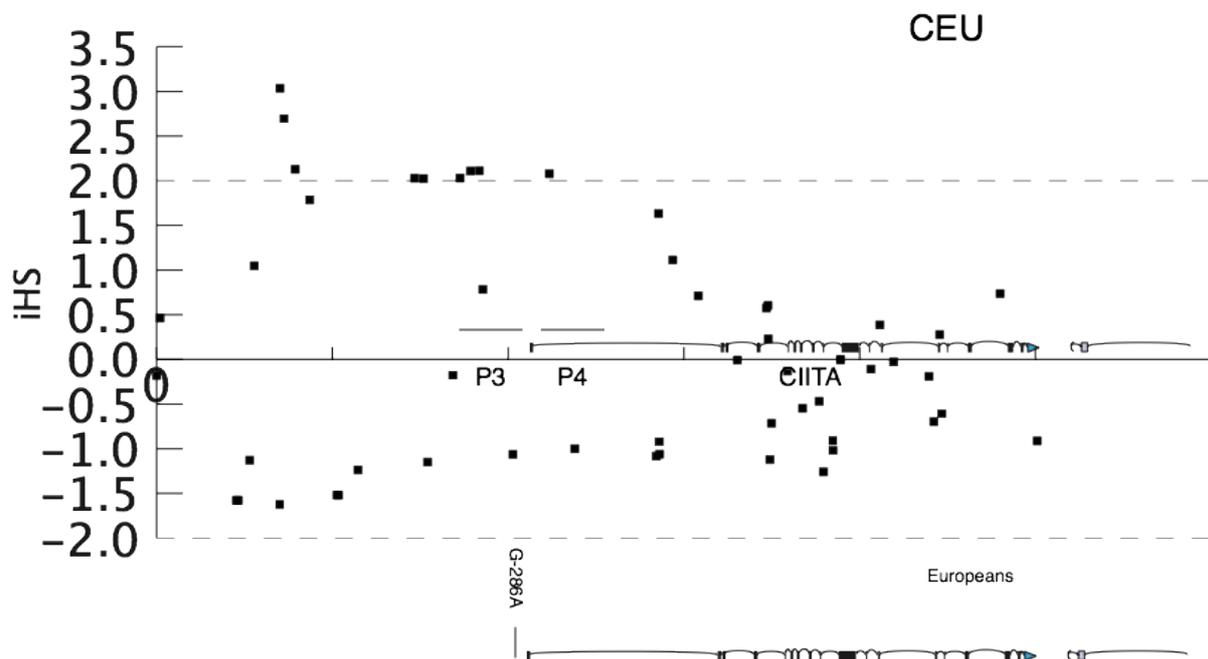


Figure 14 : Score d'haplotype intégré (iHS : integrated haplotype score) dans la population européenne, d'après Vasseur et al. (Vasseur et al. 2012).

Gene	ATG position	SNP type	Variants	Europeans	Africans	Asians	Fst _{E-Af}	Fst _{E-As}	Fst _{Af-As}
CIITA	-730	non-coding	T	0.98	1.00	0.69	0.008	0.271	0.308
CIITA		non-coding	A	0.02	0.00	0.31			
CIITA	-712	non-coding	A	0.74	0.81	0.44	0.007	0.163	0.252
CIITA		non-coding	G	0.26	0.19	0.56			
CIITA	-561	non-coding	G	0.98	1.00	0.69	0.008	0.271	0.308
CIITA		non-coding	C	0.02	0.00	0.31			
CIITA	-286	non-coding	G	0.27	0.94	0.87	0.634	0.536	0.017
CIITA		non-coding	A	0.73	0.06	0.13			

Figure 15 : Valeurs Fst extrêmes de CIITA, d'après Vasseur et al. (Vasseur et al. 2012).

4 Conclusion

Le choc septique est encore responsable de nos jours d'une morbidité et mortalité importantes à travers le monde, malgré une amélioration constante des prises en charge basées sur des recommandations internationales (Evans *et al.* 2021).

Sa physiopathologie repose sur l'interaction de systèmes complexes, le système immunitaire y jouant un rôle déterminant. En effet, l'activation des réponses immunitaires pro- et anti-inflammatoires se produit rapidement après le début du sepsis (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a). Les cellules du système immunitaire inné, notamment les monocytes et les neutrophiles, libèrent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires qui stimulent l'inflammation. En l'absence de régulation négative efficace, cette réponse hyper-inflammatoire s'auto-amplifie et conduit à des défaillances d'organes, à un état de choc et à des décès dits précoces. De façon parallèle, des mécanismes de régulation négative se mettent en place et peuvent conduire à un état d'immunosuppression favorisant l'apparition d'infections secondaires, ou encore de décès plus tardifs. Cet état d'immunosuppression se caractérise par un déficit quantitatif, avec une diminution du nombre de cellules immunitaires circulantes, mais aussi qualitatif, avec des altérations fonctionnelle et phénotypique touchant aussi bien les cellules de la réponse immunitaire innée qu'adaptative (Venet and Monneret 2018). De façon

constante, la capacité de présentation de l'antigène aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène est sévèrement altérée (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a). Même si les mécanismes moléculaires ne sont pas complètement identifiés, l'état d'immunosuppression liée au sepsis peut être détecté de façon précise par le suivi de l'expression quantitative d'HLA-DR à la surface des monocytes circulants (Döcke *et al.* 1997; Monneret *et al.* 2006; Lukaszewicz *et al.* 2009).

Parmi les gènes étudiés, *CIITA* est le régulateur principal de l'expression du CMH de classe II (Pachot *et al.* 2005a). Son expression est contrôlée principalement au niveau transcriptionnel par un module de régulation hautement conservé qui se situe dans la région promotrice du gène. La protéine CIITA, associée à un complexe multiprotéique, y est recrutée et permet d'activer la transcription des gènes du *CMH de classe II* (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).

L'expression du gène *CIITA* est quant à elle contrôlée par une large région régulatrice contenant quatre promoteurs distincts (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005). Parmi ceux-ci, le promoteur III est hautement spécifique aux cellules B mais est également le promoteur responsable de la transcription de *CIITA* dans les cellules T activées (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).

Des mutations du gène *CIITA* entraînant une mutation récessive responsable d'une immunodéficience primaire combinée sévère ont été associées au « bare lymphocyte syndrome » ou syndrome des lymphocytes nus (Dziembowska *et al.* 2002; Steimle *et al.* 1994, 1993). Or, un SNP, G-286A*rs3087456, situé dans le promoteur III de *CIITA*, a été identifié comme associé à l'apparition de maladies inflammatoires dans la population du nord de l'Europe (Swanberg *et al.* 2005; Bronson, Criswell and Barcellos 2008; Bronson *et al.* 2011; Eike *et al.* 2012). De plus, ce SNP diminuerait l'expression des transcrits de *CIITA* et d'*HLA-DR* après stimulation des leucocytes humains par l'IFN- γ (Swanberg *et al.* 2005). Enfin, des preuves d'une sélection positive de la région génomique 5' de *CIITA* ont été détectées et semblent cibler le G-286A*rs3087456 ou un haplotype qui le contient (Vasseur *et al.* 2012).

Les travaux présentés ici s'articulent autour de la compréhension des mécanismes de régulation à partir d'un polymorphisme génétique situé dans la région promotrice d'un gène impliqué dans l'expression du CMH de classe II. Dans la littérature, cette expression à la surface des monocytes circulants est

corrélée à l'importance de l'immunosuppression et à la morbi-mortalité lors du sepsis. La compréhension de ces mécanismes physiopathologiques permettrait de développer des thérapies immuno-adjuvantes ciblées dans la prise en charge du sepsis.

TRAVAUX DE RECHERCHE

1 Présentation du projet de thèse

L'importance de la mortalité dans le sepsis est due à une réponse immunitaire à l'infection dérégulée (Singer *et al.* 2016), et conduit encore actuellement à plus de 6 millions de décès par an dans le monde (Fleischmann *et al.* 2016; Reinhart *et al.* 2017). Cette réponse immunitaire dérégulée est actuellement considérée comme un paradigme dans la pathogenèse du sepsis et est reconnue comme une composante importante du pronostic (Venet and Monneret 2018). Bien que la prise en charge du sepsis soit bien standardisée (Evans *et al.* 2021), les traitements immunomodulateurs spécifiques ont montré des résultats équivoques chez les patients atteints de sepsis (Suffredini and Munford 2011; Fang *et al.* 2019). Malgré cela, des analyses post-hoc ont montré des avantages (ou des inconvénients) spécifiques dans des groupes de patients lorsqu'ils sont stratifiés par phénotype immunologique ou profil transcriptomique (Shakoory *et al.* 2016; Antcliffe *et al.* 2019; Kernan *et al.* 2019), suggérant un rôle pour l'immuno-modulation personnalisée dans le sepsis. Récemment, les thérapies ciblant la restauration du niveau d'expression d'HLA-DR à la surface des monocytes après traitement par IFN- γ ont gagné en intérêt afin d'inverser l'immunosuppression induite par le sepsis (Payen *et al.* 2019; Nguyen *et al.* 2021).

La diminution de l'expression de HLA-DR à la surface cellulaire des monocytes circulants est largement reconnue comme un marqueur de l'immunodépression induite par le sepsis, et est fortement associée à la fois à la mortalité induite par le sepsis et au risque accru d'infections secondaires (Lukaszewicz *et al.* 2009; Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a; Conway Morris *et al.* 2018). L'expression des transcriptions du CMH de classe II est contrôlée par le transactivateur de classe II (CIITA), un module de régulation hautement conservé présent dans les gènes codant pour la chaîne α et la chaîne β de toutes les molécules classiques du CMH humain de classe II (HLA-DP, -DQ et -DR) (Ting and Trowsdale 2002). Chez l'homme, le contrôle de l'activité de CIITA est médié par trois promoteurs distincts, pI (exprimé dans les cellules d'origine myéloïde), pIII (exprimé dans les cellules d'origine lymphoïde) et pIV (exprimé dans les cellules d'origine non hématopoïétique lorsqu'elles sont stimulées par l'IFN- γ), bien que l'expression spécifique des cellules et la réponse à l'IFN- γ semblent de plus en plus

interchangeables (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005; Zinzow-Kramer *et al.* 2012). L'absence d'activité du promoteur de *CIITA* entraîne un défaut d'expression des molécules HLA-DR et une immunodéficiência sévère (syndrome des lymphocytes nus) (Steimle *et al.* 1993; Mach, Steimle and Reith 1994).

En outre, le polymorphisme génétique (SNP) G-286A*rs3087456 dans le promoteur pIII de *CIITA* a été associé à des maladies rhumatologiques et à des cancers dans certaines cohortes (Swanberg *et al.* 2005; Harrison *et al.* 2007; Bronson, Criswell and Barcellos 2008; Eike *et al.* 2012; Xue *et al.* 2020).

De plus, Vasseur *et al.* ont fourni des preuves d'une sélection positive de la région génomique 5' de *CIITA* (Vasseur *et al.* 2012). La sélection positive, détectée par des tests basés sur le LD et des tests *Fst*, a été identifiée comme hautement différenciée en Europe (27 % ont une variante G, 73 % une A). En outre, le SNP G-712A*rs12596540 s'avère être en déséquilibre de liaison élevé ($r^2 > 0,6$) avec le SNP G-286A*rs3087456 (Vasseur *et al.* 2012). Une étude systématique des variants régulateurs de l'expression génétique des monocytes a montré que la régulation différentielle entre les individus dépendait de l'activité immunitaire innée, connue sous le nom de loci quantitatifs d'expression dépendant du contexte (eQTL) (Fairfax *et al.* 2014).

Dans la cadre d'une activité translationnelle de recherche fondamentale et clinique, l'objectif de l'équipe visait à explorer les mécanismes de régulation de *CIITA* et mHLA-DR en lien avec le sepsis. Les principales activités au laboratoire ont été centrées sur l'étude de l'effet des polymorphismes identifiés sur la régulation de *CIITA* et mHLA-DR, ainsi que le monitoring immunologique des effecteurs dans la réponse immunitaire innée. Nous avons aussi développé une technique de mesure de mHLA-DR adaptée à la pédiatrie. Dans un second temps, travaux présentés dans les annexes, nous avons élargi notre travail au monitoring immunologique des patients en sepsis pris en charge pour des infections à COVID-19 ou en postopératoire de transplantation hépatique. Enfin, une autre partie a consisté à évaluer l'effet d'un traitement immunomodulateur, l'IFN- γ , chez le patient en sepsis, ciblé sur la profondeur de l'immunosuppression.

De façon plus détaillée, nous avons travaillé sur :

- le SNP G-286A*rs3087456, situé sur le promoteur III de *CIITA*, et son rôle dans l'altération de l'expression d'HLA-DR monocyttaire chez les adultes atteints de choc septique. Nous avons émis l'hypothèse que les SNP affecteraient la cinétique d'expression de mHLA-DR chez les patients atteints de sepsis. A l'inverse, nous avons émis l'hypothèse que les eQTLs pourraient être modulés

par le traitement par l'IFN- γ chez les patients septiques et avons donc étudié des mécanismes de régulation moléculaires et cellulaires.

- une expérience multicentrique sur le traitement par IFN- γ d'une série de cas de patients atteints d'immunosuppression induite par le sepsis, présentée dans les annexes.
- une validation de la mesure pédiatrique sur un petit volume sanguin de mHLA-DR au lit du malade dans une unité de soins intensifs.
- une étude pilote sur les phénotypes myéloïdes dans les cas graves de COVID-19 chez l'adulte permettant de prédire l'infection secondaire et la mortalité, présentée dans les annexes.
- le projet SEPTIFOIE : un protocole d'étude des biomarqueurs des infections associées aux soins et à de l'immunodépression après une transplantation hépatique en pédiatrie, présenté dans les annexes.

2 Polymorphisme génétique du promoteur de CIITA et altération de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes chez les patients en choc septique

2.1 Contexte

La mesure d'un faible niveau d'expression d'HLA-DR, une molécule du CMH de classe II, à la surface des monocytes (mHLA-DR) est un marqueur d'immunosuppression, et est associée à la mortalité et à l'apparition d'infections secondaires dans le sepsis chez l'adulte. Le transactivateur du CMH de classe II, *CIITA*, est le régulateur principal de l'expression des molécules du CMH de classe II et plusieurs preuves de sélection positive sur la région 5' du gène ont été recueillies dans la population européenne. En effet, même si son rôle n'a pas encore été défini, l'haplotype sélectionné contient un SNP (G-286A*rs3087456) qui a été associé à plusieurs maladies auto-immunes dans les populations européennes. Etant donné le rôle de mHLA-DR dans l'immunosuppression liée au sepsis, nous avons voulu étudier le lien entre le SNP G-286A*rs3087456 (et le SNP G-712A*rs12596540 en déséquilibre de liaison) et le pronostic des patients en choc septique, ainsi que les mécanismes de régulation de l'expression de mHLA-DR en fonction de l'haplotype.

2.2 Description de l'étude

Les principaux objectifs de cette étude étaient :

- Déterminer si le SNP G-286A*rs3087456 ou le SNP lié, G-712A*rs12596540, pourraient avoir été sélectionnés dans la population européenne pour résister au sepsis, et élucider le rôle de ces SNPs dans l'immunosuppression du sepsis. Pour cela, des patients en choc septique ont été génotypés pour les variants génétiques de pIII (G-286A*rs3087456 et G-712A*rs12596540) et la mesure itérative de l'expression de mHLA-DR a été réalisée au cours de l'hospitalisation.
- Décrire les mécanismes potentiels de régulation moléculaire et cellulaire via l'analyse des modifications liées aux SNPs sur leurs activités *ex vivo* et *in*

vitro. C'est pourquoi les effets de l'exposition à l'IFN- γ sur l'expression de mHLA-DR ont été étudiés chez des témoins sains génotypés, ainsi que les effets de l'exposition à l'IFN- γ sur l'expression des isoformes pIII et pIV, évalués par PCR quantitative en temps réel. Enfin, l'activité du promoteur III de *CIITA*, en association avec le génotype G-286A*rs3087456, a été explorée à l'aide d'un test gène rapporteur Dual-luciférase.

- Soutenir l'utilisation du génotypage de *CIITA* comme marqueur de la sévérité du sepsis afin de discriminer les patients qui devraient recevoir un traitement expérimental basé sur l'IFN- γ .

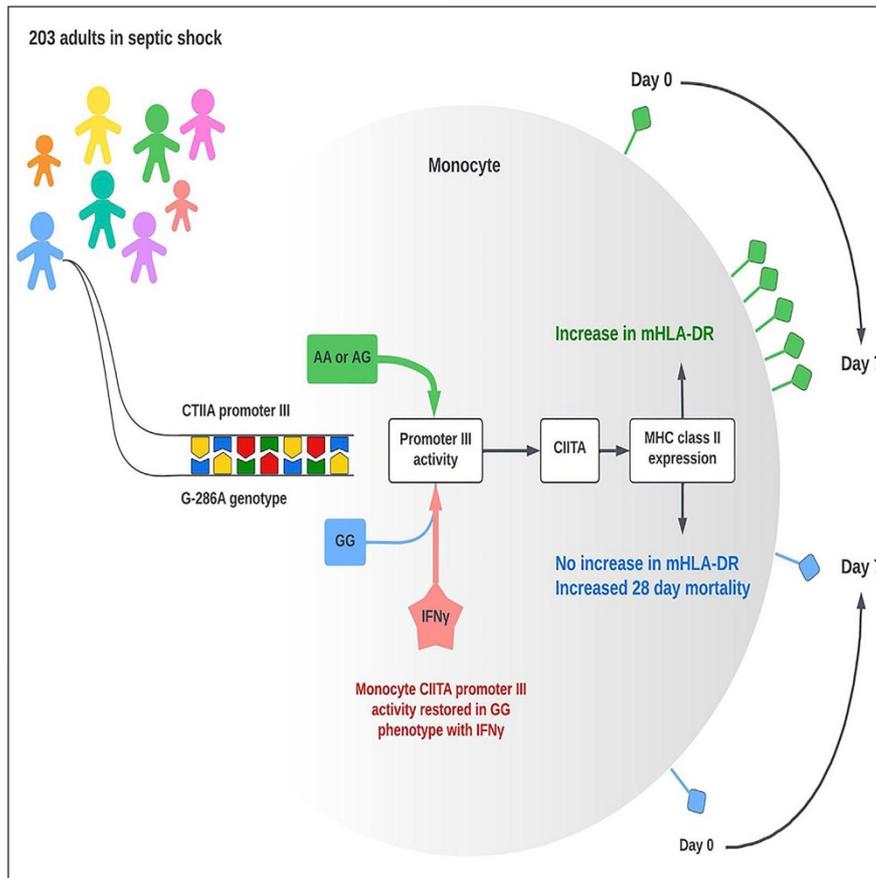
2.3 Résultats et conclusion

Le génotypage de 203 patients présentant un choc septique montrait que, dans un modèle dominant pour le SNP G-286A*rs3087456, le génotype GG était associé à une augmentation du risque de décès à 28 jours. De plus, chez ces patients, l'expression de mHLA-DR restait abaissée chez les patients de génotype GG alors qu'il augmentait pendant la première semaine de soins intensifs chez les patients de génotype AA ou AG. Dans des cellules *ex vivo* provenant de patients contrôles sains, l'expression de mHLA-DR pour le SNP G-286A*rs3087456 n'augmentait pas de manière significative chez les patients de génotype GG, par rapport aux patients contrôles de génotype AG ou AA, lors de l'exposition à l'IFN- γ , mettant en évidence un mécanisme par lequel le génotype GG pouvait être associé à une expression mHLA-DR altérée dans le sepsis. Cependant, les niveaux des transcrits (ARNm) du pIII étaient similaires dans les monocytes de contrôle sains, indépendamment du génotype et de l'exposition à l'IFN- γ . Enfin, l'activité du promoteur III était diminuée dans la lignée cellulaire de monocytes de génotype GG mais restaurée après stimulation par l'IFN- γ , ce qui suggérait l'existence de voies alternatives pour l'expression différentielle de mHLA-DR en association avec les polymorphismes de pIII.

Nous avons démontré ici que G-286A*rs3087456 a un impact significatif sur l'expression de mHLA-DR chez les patients atteints de choc septique, en partie par l'intermédiaire de l'activité du promoteur III de *CIITA*, cette activité pouvant être restaurée par l'IFN- γ . Ces données offrent une nouvelle perspective sur la susceptibilité génétique au sepsis et de nouvelles voies pour la recherche translationnelle sur les éléments régulateurs des gènes liés au CMH de classe II dans les maladies complexes associées à une dysrégulation immunitaire.

Article

CIITA promoter polymorphism impairs monocytes HLA-DR expression in patients with septic shock



Jordi Miatello,
Anne-Claire
Lukaszewicz,
Michael J. Carter,
..., Didier Payen,
Michele Boniotto,
Pierre Tissières

pierre.tissieres@i2bc.
paris-saclay.fr

Highlights

CIITA G-286A*rs3087456
polymorphism impact
mortality in septic shock

CIITA G-286A*rs3087456
reduces promotor activity
and influences mHLA-DR
expression

Downregulatory role of
this SNP on mHLA-DR can
be reverse by IFN- γ in
septic patients

Miatello et al., iScience 25,
105291
November 18, 2022 © 2022
The Authors.
[https://doi.org/10.1016/
j.isci.2022.105291](https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105291)



Article

CIITA promoter polymorphism impairs monocytes HLA-DR expression in patients with septic shock

Jordi Miatello,^{1,2,3} Anne-Claire Lukaszewicz,^{4,5} Michael J. Carter,^{2,6,7} Valérie Faivre,^{8,9} Stéphane Hua,¹⁰ Kim Z. Martinet,¹¹ Christine Bourgeois,¹¹ Lluís Quintana-Murci,^{12,13} Didier Payen,¹⁴ Michele Boniotta,^{15,16} and Pierre Tissières^{1,2,3,16,17,*}

SUMMARY

Low monocyte (m)HLA-DR expression is associated with mortality in sepsis. G-286A*rs3087456 polymorphism in promoter III of HLA class II transactivator (CIITA), the master regulator of HLA, has been associated with autoimmune diseases but its role in sepsis has never been demonstrated. In 203 patients in septic shock, GG genotype was associated with 28-day mortality and mHLA-DR remained low whereas it increased in patients with AA or AG genotype. In ex vivo cells, mHLA-DR failed to augment in GG in comparison with AG or AA genotype on exposure to IFN- γ . Promoter III transcript levels were similar in control monocytes regardless of genotype and exposure to IFN- γ . Promoter III activity was decreased in GG genotype in monocyte cell line but restored after stimulation with IFN- γ . Hereby, we demonstrated that G-286A*rs3087456 significantly impact mHLA-DR expression in patients with septic shock in part through CIITA promoter III activity, that can be rescued using IFN- γ .

INTRODUCTION

Sepsis is a life-threatening condition because of a dysregulated immune response to infection (Singer et al., 2016), and leads to more than 6 million deaths per year (Fleischmann et al., 2016; Reinhart et al., 2017). Dysregulated immune response is currently considered as a paradigm in pathogenesis of sepsis and recognized as an important component of sepsis prognosis (Venet and Monneret, 2018). Although the management of sepsis is well standardized (Evans et al., 2021), specific immunomodulatory therapies, such as high dose steroids (Minneci et al., 2009), anti-endotoxin (Ziegler et al., 1991), inhibitors of pro-inflammatory cytokines IL-1, TNF- α , IL-6 (Eichacker et al., 2002; Shakoory et al., 2016), and anticoagulants such as activated protein C (Abraham et al., 2005; Warren et al., 2002) have shown equivocal results in patients with sepsis (Fang et al., 2019; Suffredini and Munford, 2011). Despite this, *post-hoc* analyses have shown specific benefits (or harms) in groups of patients when stratified by immunological phenotype or transcriptomic profile (Antcliffe et al., 2019; Kernan et al., 2019; Shakoory et al., 2016), suggesting a role for personalized immunomodulation in sepsis. Recently, therapies targeting the restoration of monocyte (m)HLA-DR level with interferon (IFN)- γ as gain interest to reverse sepsis-induced immunodepression (Nguyen et al., 2021; Payen et al., 2019) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01649921, NCT01374711).

Decreased expression of HLA-DR – an MHC class II molecule required for antigen presentation to T cells – on the cell surface of circulating monocytes is widely recognized as a marker of sepsis-induced immunodepression and is strongly associated with both sepsis-induced mortality and increased risk of secondary infections (Conway Morris et al., 2018; Hotchkiss et al., 2013; Lukaszewicz et al., 2009). MHC class II transcript expression is controlled by the class II transactivator (CIITA), a highly conserved regulatory module found in the genes encoding the α -chain and β -chain of all classical human MHC class II molecules (HLA-DP, -DQ, and -DR) (Ting and Trowsdale, 2002). In humans, control of CIITA activity is mediated by three distinct promoters, pI (expressed in cells of myeloid origin), pIII (expressed in cells of lymphoid origin) and pIV (expressed in cells of non-hematopoietic origin when stimulated by IFN- γ), although the cell-specific expression and response to IFN- γ increasingly appears interchangeable (Reith et al., 2005; Zinzow-Kramer et al., 2012). Absence of CIITA promoter activity results in a failure to express HLA-DR molecules and severe

¹Institute of Integrative Biology of the Cell, CNRS, CEA, Paris-Saclay University, Gif-sur-Yvette, France

²Paediatric Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP, Paris-Saclay University, Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France

³FHU Sepsis, AP-HP, Paris-Saclay University, INSERM, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁴EA 7426 P13 (Pathophysiology of Injury-induced Immunosuppression), Hospices Civils de Lyon/ Lyon University/bioMérieux, E. Herriot Hospital, Lyon, France

⁵Anesthesia and Critical Care Medicine Department, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

⁶Department of Women and Children's Health, School of Life Course Sciences, King's College London, London, UK

⁷Paediatric Intensive Care, Evelina London Children's Hospital, Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust, London, UK

⁸Saint-Louis Lariboisière Hospital, AP-HP, Denis Diderot University, Paris, France

⁹INSERM UMR1141 Neurodiderot, Université Paris Cité, France

¹⁰CEA, INRAE, Medicines and Healthcare Technologies Department, SIMoS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

¹¹Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-Immune, Hematological and Bacterial Diseases (IMVA-HB/IDMIT), Fontenay-aux-Roses, France

Continued



immunodeficiency (bare lymphocyte syndrome). (Mach et al., 1994; Steimle et al., 1993). In addition, G-286A*rs3087456 single nucleotide polymorphism (SNP) in the *CIITA* promoter pIII has been associated with rheumatological disease and cancer in some cohorts (Bronson et al., 2008; Eike et al., 2012; Harrison et al., 2007; Swanberg et al., 2005; Xue et al., 2020). Moreover, Vasseur et al. provided some evidence of a positive selection of the 5' genomic region of *CIITA* (Vasseur et al., 2012). The positive selection, detected by LD-based tests and *Fst* tests, identified as highly differentiated in Europe (27% have a G variant, 73% an A). In addition, SNP G-712A*rs12596540 is shown to be in high linkage disequilibrium ($r^2 > 0.6$) with SNP G-286A*rs3087456 (Vasseur et al., 2012). A systematic investigation of regulatory variants on monocyte gene expression showed that differential regulation between individuals was dependent on innate immune activity, known as context-dependent expression quantitative loci (eQTLs) (Fairfax et al., 2014). Considering the role of *CIITA* in the regulation of HLA-DR, and its association with immune-inflammatory diseases, we therefore investigated the relationship between genetic variation in the *CIITA* promoter, HLA-DR expression and outcome. We hypothesized that linked SNPs in the *CIITA* promoter pIII (G-286A*rs3087456, characterized by the presence of G>A SNP at chr16:10877045, GRCh38.p13 or G-712A*rs12596540, characterized by A>G at chr16:10876619, GRCh38.p13 (Vasseur et al., 2012)) would affect mHLA-DR expression kinetics in patients with sepsis. Conversely, we hypothesized that eQTLs may be modulated by IFN- γ treatment in septic patients and therefore investigated the molecular and cellular regulatory mechanisms.

RESULTS

Severity and mortality in septic shock in association to *CIITA* G-286A*rs3087456 and G-712A*rs12596540 genotypes

Of 221 patients with septic shock recruited to the study, daily data from day of ICU admission to ≥ 7 days and genomic DNA was available from 203 patients (Figure S1). The median age of the study cohort was 61 years (range: 18-94), with a majority of men (65%) (Table 1). The cohort had a high degree of disease on admission, as indicated by a median SOFA score of 7 (range: 1-16) (Table 1). Almost a quarter of the patients were surgical patients (23.7%) and the majority of sepsis (53.7%) was of pulmonary origin (Table 1).

Allele frequency and genotype distribution were G-286A*rs3087456: AA 45%, AG 41%, GG 13%; G-712A*rs12596540: AA 56%, AG 37%, GG 7%. Both polymorphisms met the Hardy Weinberg law in our cohort. No significant association was found for both SNPs with clinical severity scores (SAPS II and SOFA scores) at day 1 of ICU admission, although patients who had the *CIITA* G-712A*rs12596540 GG genotype had a higher lymphocyte count at day 1 ($p = 0.005$, Table 1). In an A-dominant model, patients homozygous for *CIITA* pIII G-286A*rs3087456 GG genotype had a significant increased risk of 28-day mortality (55.6% for GG genotype vs. 35.2% for AA and AG genotypes, OR: 2.298, CI 95% [1.013-5.217], $p = 0.043$) (Table 2). There was also a non-significant trend toward an increase in 7-day mortality for GG genotype for G-712A*rs12596540 (AA or AG: 25.9% vs. GG: 50%, OR: 2.857, CI 95% [0.954-8.558], $p = 0.05$) (Table 2). No association was found for secondary infections between the different genotypes of *CIITA* pIII gene in both SNPs (Table 2). We further evaluated the impact of both SNPs on mHLA-DR expression in septic shock patients, using the A-dominant model.

Monocyte HLA-DR surface expression in septic shock in association with *CIITA* G-286A*rs3087456 and G-712A*rs12596540 genotypes

Longitudinal measurements of circulating mHLA-DR expression were measured during the ICU stay. For G-712A*rs12596540 and G-286A*rs3087456, septic patients with AA or AG genotype showed a significant early increase in mHLA-DR level, whereas patients with GG genotype displayed a persistent low mHLA-DR values (Wilcoxon signed rank test, $p < 0.03$ vs. basal) (Figure 1).

Ex vivo mHLA-DR surface expression in healthy controls following IFN- γ stimulation in association with G-286A*rs3087456 and G-712A*12596540

To investigate the functional role of *CIITA* pIII polymorphisms, we measured basal HLA-DR expression in monocytes from 50 healthy controls and evaluated the response of monocytes to IFN- γ exposure. Of these 50 healthy controls, 26 had the AA genotype, 18 had the AG genotype and 6 had the GG genotype for G-286A*rs3087456, respectively; and 29 had the AA genotype, 15 had the AG genotype and 6 had the GG genotype for G-712A*rs12596540, respectively. At baseline (no IFN- γ) there was no difference between different genotypes in both polymorphisms (G-286A*rs3087456: AA or AG = 1371 [95%CI, 1154 to 1625] MFI vs. GG = 1192 [95% CI, 864 to 2207] MFI, $p = 0.87$; G-712A*rs12596540: AA or

¹²Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR2000, Human Evolutionary Genetics Unit, Paris, France

¹³Chair Human Genomics and Evolution, Collège de France, Paris, France

¹⁴Denis Diderot University, Paris, Sorbonne, Cité Paris, France

¹⁵University Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Translational Neuropsychiatry, 94010 Créteil, France

¹⁶These authors contributed equally

¹⁷Lead contact

*Correspondence: pierre.tissieres@i2bc.paris-saclay.fr

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105291>



Table 1. Baseline characteristics of patients in septic shock

	G-286A*rs3087456				P Value *	G-712A*rs12596540				P Value *
	AA (n = 92)	AG (n = 84)	GG (n = 27)	All (n = 203)		AA (n = 113)	AG (n = 76)	GG (n = 14)	All (n = 203)	
Age, years	62 (18-91)	60 (19-94)	63 (30-88)	61 (18-94)	0.25	62 (18-91)	59 (19-94)	58 (33-88)	61 (18-94)	0.73
Gender, % male	68.5	59.5	70.4	65	0.38	66.4	63.2	64.3	65	0.90
SAPS II	49 (22-120)	49 (15-96)	45 (19-93)	49 (15-120)	0.44	48 (22-120)	50 (15-96)	44 (19-65)	49 (15-120)	0.58
SOFA	7 (2-15)	7 (2-16)	7 (1-16)	7 (1-16)	0.87	7 (2-15)	7 (2-16)	7 (1-11)	7 (1-16)	0.91
Surgical, %	22.8	25	22.2	23.6	0.93	21.2	26.3	28.6	23.6	0.65
Sepsis origin, %										
Lung	54.3	50	59.3	53.7	0.67	56.7	47.4	64.3	53.7	0.36
Abdomen	20.7	22.6	14.8	20.7	0.68	20.4	21.1	21.4	20.7	0.99
Urinary	4.3	4.8	3.7	4.4	0.97	3.5	5.3	7.1	4.4	0.75
Laboratory variables										
Leukocyte count, x 10 ³ /mm ³	11.4 (0.1-55)	12.4 (0.1-92.5)	9.1 (0.4-32.7)	11.4 (0.1-92.5)	0.76	10.7 (0.1-55)	12.3 (0.1-92.5)	15.8 (1.8-32.7)	11.4 (0.1-92.5)	0.42
Neutrophil count, x 10 ³ /mm ³	10.1 (0.1-46.2)	10.4 (0.1-74.9)	8.4 (0.5-29.3)	9.1 (0.1-74.9)	0.56	9.3 (0.1-46.2)	10.4 (0.1-74.9)	9.7 (1-28.4)	9.1 (0.1-74.9)	0.84
Lymphocyte count, x 10 ³ /mm ³	0.7 (0.1-11.9)	0.6 (0.1-5.8)	0.9 (0.2-2.5)	0.7 (0.1-11.9)	0.17	0.6 (0.1-11.9)	0.7 (0.1-3.7)	1.7 (0.2-2.5)	0.7 (0.1-11.9)	0.005
Monocyte count, x 10 ³ /mm ³	0.5 (0.1-2.7)	0.6 (0.1-4.6)	0.5 (0.1-7.9)	0.6 (0.1-7.9)	0.87	0.5 (0.1-2.9)	0.6 (0.1-4.6)	0.9 (0.1-7.9)	0.6 (0.1-7.9)	0.24

SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II; SOFA = Sequential Organ Failure Assessment. Data are median (interquartile range) for continuous variable. *p values were calculated with the use of chi-square test and Kruskal-Wallis test.

AG = 1374 [95%CI, 1154 to 1642] MFI vs. GG = 1137 [95%CI, 864 to 1889] MFI, $p = 0.45$; [Figure 2](#). Following IFN- γ stimulation, mHLA-DR significantly increased in healthy controls with AA or AG genotype for both alleles (G-286A*rs3087456: 1371 vs. 3919 MFI [CI 95%, 1521 to 2934], $p < 0.0001$; G-712*rs12596540: 1374 vs. 3889 MFI [CI 95%, 1400 to 2843], $p < 0.0001$; [Figure 2](#)). In contrast, there was a non-significant trend to augment mHLA-DR expression from healthy controls with GG genotype for G-286A*rs3087456 (1192 vs. 1898 MFI [CI 95%, -186 to 1652], $p = 0.09$; [Figure 2](#)). Healthy controls with GG genotype for G-712A*rs12596540 showed a significant ability to augment mHLA-DR expression in response to IFN- γ stimulation (G-712A*rs12596540: 1137 vs. 2021 MFI [CI 95%, 132 to 1854], $p < 0.05$; [Figure 2](#)).

Those results need to be interpreted in regard to the effect of SNP G-286A*rs3087456 on *CIITA* expression.

Ex vivo *CIITA* promoter isoforms expression in association with G-286A*rs3087456

To determine whether the G-286A*rs3087456 polymorphism was associated with different expression of isoforms of the *CIITA* promoter pIII and pIV, we quantified mRNA from ex vivo healthy control purified monocytes (CD14⁺) and B cells (CD19⁺) by Q-PCR. In monocytes, there was no difference in basal expression level of pIII ($p = 0.18$) and pIV transcripts ($p = 0.24$) between AA or AG and GG genotypes ([Figure 3](#)). Following 6 h of ex vivo cells stimulation with IFN- γ , pIII and pIV transcripts were significantly up-regulated in monocytes for AA or AG as well as GG genotype ($p < 0.0001$, [Figure 3](#)). In B cells, no difference was observed in pIII or pIV transcripts expression in unstimulated cells.

Therefore, G-286A*rs3087456 genotype did not impact ex vivo basal expression of *CIITA* promoter isoforms, and all three genotypes (AA, AG, GG) were similarly inducible by IFN- γ in monocytes from healthy controls, but not in B cells. We therefore evaluated the effect of G-286A*rs3087456 on the transcriptional activity of the promoter *CIITA* pIII activity in different leukemoid cell lines.



Table 2. Genotyped related mortality

A-dominant model										
	G-286A ^a rs3087456					G-712A ^a rs12596540				
	AA or AG (n = 176)	GG (n = 27)	OR	95% CI	P Value ^a	AA or AG (n = 189)	GG (n = 14)	OR	95% CI	P Value ^a
28-day mortality, n (%)	62 (35.2)	15 (55.6)	2.298	1.013-5.217	0.043	69 (36.5)	8 (57.1)	2.319	0.773-6.960	0.13
7-day mortality, n (%)	46 (50)	10 (37)	1.662	0.710-3.891	0.24	49 (25.9)	7 (50)	2.857	0.954-8.558	0.05
Secondary infections, n (%)	39 (20.7)	4 (14.8)	0.611	0.199-1.872	0.38	41 (21.7)	2 (14.3)	0.602	0.129-2.796	0.49
Co-dominant model										
	G-286A ^a rs3087456					G-712A ^a rs12596540				
	AA (n = 92)	AG (n = 84)	GG (n = 27)	All (n = 203)	P Value ^a	AA (n = 113)	AG (n = 76)	GG (n = 14)	All (n = 203)	P Value ^a
28-day mortality, n (%)	35 (38)	27 (32.1)	15 (55.6)	77 (37.9)	0.10	45 (39.8)	24 (31.6)	8 (57.1)	77 (37.9)	0.16
7-day mortality, n (%)	25 (27.2)	21 (25)	10 (37)	56 (27.6)	0.47	31 (27.2)	18 (23.7)	7 (50)	56 (27.6)	0.13
Secondary infections, n (%)	19 (20.7)	20 (23.8)	4 (14.8)	43 (21.2)	0.61	23 (20.3)	18 (23.7)	2 (14.3)	43 (21.2)	0.70

^ap values were calculated with the use of chi-square test and Kruskal-Wallis test.

In vitro CIITA type III promoter activity in association with rs3087456 genotype

Dual luciferase reporter gene assays were used to detect specific *CIITA* promoter activity. Unexpectedly, after transfection into a monocyte-like cell line (U937), G-286A*rs3087456 pIII activity was significantly lower than in wild-type (WT) construct ($p < 0.001$) (Figure 4). Following 6 h stimulation with IFN- γ , activity of G-286A*rs3087456 pIII recovered a similar activity than WT promoter ($p < 0.001$) (Figure 4). As alternative isoforms of pIII are specific to B and activated-T cells, we transfected a B lymphocyte-like cell line (Raji) and a T lymphocyte-like cell line (Jurkat T). In B cells, luciferase activity of G-286A*rs3087456 pIII was significantly lower in comparison with WT promoter ($p < 0.05$), and IFN- γ did not restore activity of mutated pIII ($p = 0.23$) (Figure 4). For T cells, transfection of G-286A*rs3087456 pIII did not affect baseline promoter activity, nor was pIII activity increased in response to IFN- γ stimulation for transfected or WT promoter (Figure 4). Thus, although *CIITA* pIII basal activity was reduced in monocytes transfected with G-286A*rs3087456 than WT, *CIITA* pIII activity was fully restored in G-286A*rs3087456 following IFN- γ stimulation.

DISCUSSION

In this study, we showed that G-286A*rs3087456 *CIITA* pIII polymorphism is associated with an increase 28-day mortality in septic shock and a decreased ability to increase mHLA-DR expression across the trajectory of ICU admission. We showed that G-286A*rs3087456 *CIITA* polymorphism impairs basal activity of pIII promoter without altering *CIITA* pIII and pIV isoforms expression, but this reduced activity is fully rescuable by IFN- γ . Difference in the induction profiles between *in vitro* promoter activity and *ex vivo* transcripts expression suggests that IFN- γ may act as a transcriptional inducer in G-286A*rs3087456 but not in WT, where effect appears at a post-transcriptional level (e.g., transcript stabilization).

Genetic polymorphisms are widely recognized as important determinants of the host response to pathogens and have been strongly selected in human evolution (Quintana-Murci, 2019). Such polymorphisms may be pathogen-specific immunodeficiencies (Casanova and Abel, 2007), and/or only quantifiable following immune challenge, i.e. eQTLs, that are dependent on innate immune context (Fairfax et al., 2014). Here, we provide data supporting a functionally important variant of the *CIITA* promoter III on mHLA-DR expression in patients and *ex vivo* experiments, which in turn is associated with poor outcome in sepsis and may be a realistic target for personalized immunomodulation.

The effect of the G-286A*rs3087456 polymorphism on the regulation of HLA-DR expression has not been previously studied. To our knowledge, this is the first study to investigate the regulatory effects of this promoter polymorphism. Our results suggest that GG genotype alters pIII activity in monocytes and B cells but

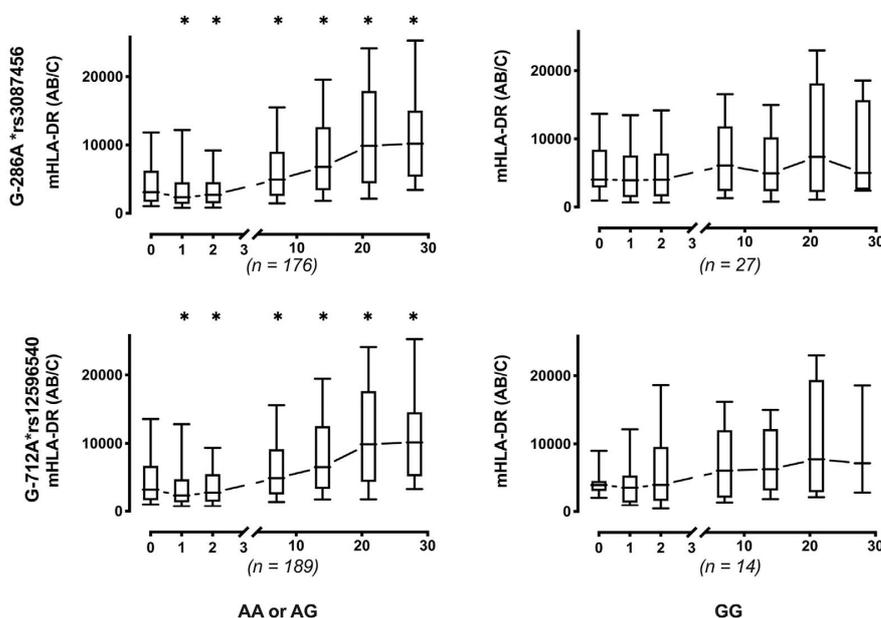


Figure 1. Monocyte HLA-DR expression in 203 patients with septic shock

Circulating monocyte HLA-DR expression is expressed as number of antibodies bound per cell (AB/C). Results are presented as median with 95% CI and by genotype of *CIITA* rs12596540 and G-286A*rs3087456 in a dominant model. * $p < 0.03$ vs. basal (Wilcoxon signed rank test).

not in T cells, in a cell-type specific manner. Unexpectedly, on basal condition (e.g., monocytes and B lymphocytes from healthy volunteers), pIII related transcripts induction is not significantly different between all haplotypes. Following *ex vivo* stimulation with IFN- γ , pIII transcripts expression was increased only in monocytes in both GG and AA or AG genotypes. Similarly, pIV transcripts expression is not different in the basal condition, but expression increases after IFN- γ only in monocytes. These suggest that, in healthy condition, transcriptional induction counteracts altered promoter activity of GG or repressor inhibit transcription in AA or AG haplotypes, both hypotheses encompassing complex transcription regulatory mechanisms.

This study was unable to identify the precise mechanisms by which *CIITA* pIII polymorphisms are associated with decreased mHLA-DR expression in individuals homozygous for G-286A*rs3087456. This is unsurprising given the heterogeneity of transcriptional response during sepsis and complexity of HLA-DR gene regulation. Recently, immune-enhancing CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides (ODNs) have been described as having a role in regulating expression of MHC class II and costimulatory molecules. Wang et al. (2007) showed that non-CpG ODNs (rODNs) downregulate HLA-DR expression in monocytes and block promoter III-directed transcription of *CIITA* in these cells. The precise inhibitory molecular effects of rODN on pIII activity are not understood, and more specifically, its precise promoter interaction not studied. Lohsen et al. (2014) described a distal regulatory element, known as hypersensitive site 1 - HSS1 (located ~3kb upstream of pI) with PU.1, NF- κ B, and Sp1 interacting with pIII through a looping interaction. Of interest, proximal regulatory elements were described, and include inducers (e.g., AP-1, Sp1, CREB, NF-Y, ARE-1, ARE-2), and repressors (e.g., PRDI-BF1/BLIMP-1, ZBTB32). Other mechanisms are involved in *CIITA* expression regulation. Among these, in B cells, restricted access of pI because of extensive DNA methylation induces a switch to pIII activation (Lohsen et al., 2014). The -300 region of *CIITA* has been well identified as an important proximal regulatory region (Ghosh et al., 1999). It is plausible that pIII G-286A*rs3087456 polymorphism may interfere with transcription in monocyte during sepsis and *CIITA* expression be rescued through IFN- γ stimulation. Whether this may be directly related to a *cis*- or *trans*-regulatory mechanism is unknown. Ni et al. (2008) identified a dependent distal enhancer regulating IFN- γ -induce expression of *CIITA* through pIV. This IFN- γ induce promoter activation is dependent on BRG1, an ATP-dependent remodeling factor, which promotes the formation of a dynamic three-dimensional chromatin loop and demonstrates the importance of distant enhancer/silencer

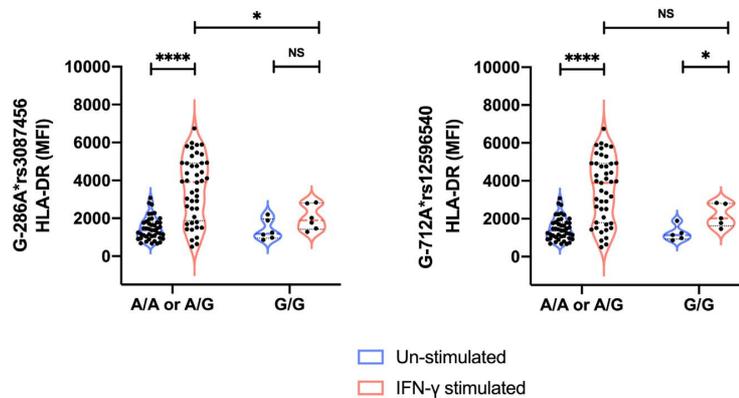


Figure 2. Ex vivo HLA-DR expression in monocytes of healthy controls

Results are presented as violin plot with median and quartiles lines, and by genotype of *CIITA* G-712A*rs12596540 and G-286A*rs3087456 in an A-dominant model (results for the co-dominant model presented in Figure S2). p values were calculated using Mann-Whitney Test. ****p < 0.0001 and *p < 0.05.

regions in *CIITA* expression regulation. In our study we showed that expression in monocyte of pIV isoforms following IFN- γ is ~2.7-fold higher than pIII, which confirms the preferential activation of pIV after IFN- γ induction. Altogether, these facts support the evidence that IFN- γ is a preferential inducer of *CIITA* expression that may overcome monocytic MHC class II phenotype triggered by G-286A*rs3087456 polymorphism in septic patients. The detailed transcriptional mechanism is unknown but the complexity of the regulation of *CIITA* expression renders difficult the precise determination out of high-throughput promoter analysis.

CIITA has been shown to regulate the expression of several non-MHC class II immune related genes such as interleukin (IL)-4, collagen $\alpha 2$, Fas ligand, and plexin A1 (Ting and Trowsdale, 2002). *CIITA* was able to inhibit MMP-9 expression, a matrix metalloproteinase involved in the degradation of extracellular matrix in lung injury associated with sepsis (Nozell et al., 2004). This effect was mediated by the binding and sequestration of CREB binding protein by *CIITA*, and therefore a reduction in promoter activity for MMP-9 – illustrating the complexity of *CIITA*-mediated signaling through transcriptional, and non-transcriptional pathways. Promoters of *CIITA* have previously been implicated in autoimmune diseases, highlighting their role in immunoregulation more broadly (Swanberg et al., 2005; Vasseur et al., 2012). Indeed, the greatest challenge to a true understanding of gene regulation in monocytes is likely to be the integration of proximal (cis) and distal (trans) regulatory effects on genetic loci in complex disease, rather than *in vitro* (Fairfax et al., 2014).

Hereby, we have showed that homozygosity for G-286A*rs3087456 was associated with low mHLA-DR expression in patients with sepsis, and that IFN- γ was able to restore *CIITA* promoter III activity. In the seminal article by Döcke et al. (1997), authors showed that IFN- γ was able to restore monocyte functions in 8 patients with sepsis. More recently, in a cohort of 20 pediatrics and adults' patients with sepsis, we showed that immunotherapy with IFN- γ was safe to improve the immune host defense, particularly the monocyte HLA-DR expression in patients with prolonged downregulation of mHLA-DR, and was associated with a very high survival rate (Nguyen et al., 2021; Payen et al., 2019). These results may suggest the use of IFN- γ as a targeted immune therapy on G-286A*rs3087456 homozygotes GG to rescue mHLA-DR expression. Leentjens et al. (2012) suggested in healthy volunteers with LPS-induced immunoparalysis that the modulatory effect of IFN- γ is variable, despite the significant increase in mHLA-DR expression. Of interest, GM-CSF did not induce a significant increase in mHLA-DR in this study (Leentjens et al., 2012). This is in agreement with the study of Hornell et al. (2003) showing that GM-CSF increase *CIITA* type I and III transcript expression but not of type IV. The use of mHLA-DR to assess the risk of secondary infection after septic shock is well admitted (Lukaszewicz et al., 2010; Wu et al., 2011). The use of a threshold of 8,000 AB/C to define a reduction in mHLA-DR expression to diagnose an acquired immunosuppression gets more credence, in particular if it is lasting after day 3 post admission (Monneret et al., 2006; Payen et al., 2019). Hereby, we showed that rs3087456 GG genotype was significantly associated with unresolving low mHLA-DR kinetics, predicting a persistent immunodepression phenotype in patients with septic shock.

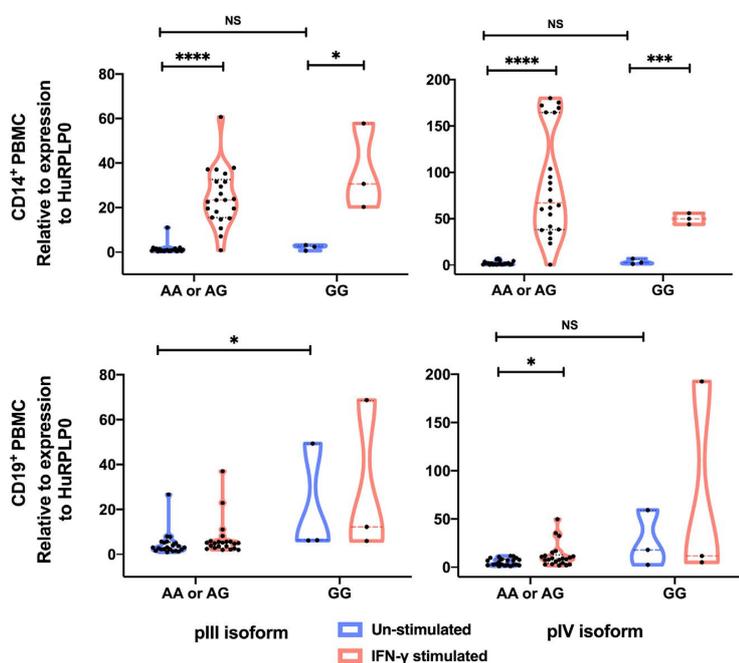


Figure 3. Ex vivo mRNA levels for promoter III and IV isoforms

mRNA level in positively selected CD14⁺ (monocytes) and CD19⁺ (lymphocytes) from healthy controls. Cells were stimulated or not with IFN- γ during 6h before qPCR. Results are presented as truncated violin plot with median and quartiles lines and by genotype of *CIITA* G-286A*rs3087456 in an A-dominant model. p values were calculated using Mann-Whitney Test. ****p < 0.0001, ***p < 0.001 and *p < 0.05.

This study raised number of questions. Among these, the specific effect of *CIITA* G-286A*rs3087456 on *CIITA* transcripts expression in septic patients is unknown. It is probable that regulatory mechanism (e.g., acute phase response, cytokines, steroids, adrenergic drugs) encountered during sepsis may significantly modified both transcriptional and post-transcriptional regulation of *CIITA*, but regarding the rarity of this SNP, the necessity of immediate *ex vivo* experiments, such study may be difficult to realize.

This study provides two important insights: First, a genetic susceptibility affecting MHC class II master regulator *CIITA* has been shown to be associated with defective mHLA-DR expression in patients with septic shock and dismal outcome. This allows us to anticipate the onset of sepsis-induced immunosuppression. Second, the demonstration of the effect of IFN- γ in restoring the functional consequence of this genotype, suggests the use of this genetic biomarker to identify patients who may benefit of IFN- γ -based immunomodulatory therapy. In conclusion, we report that *CIITA* G-286A*rs3087456 GG genotype is associated with impaired mHLA-DR expression in septic shock, predictive of development of persistent immunosuppression, and demonstrate the effect of IFN- γ to rescue altered MHC class II expression.

Limitations of the study

There are some limitations to be discussed. First, to validate that *CIITA* G-286A*rs3087456 polymorphism can be considered as a biomarker of susceptibility to worsening prognosis in patients with septic shock, a study on a larger cohort of patients would be necessary. Second, because of inclusion before the release of the new definition of septic shock (Singer et al., 2016), patients were included on the criteria of sepsis with organ failure and hypotension despite adequate volume resuscitation (Levy et al., 2003). This definition remains close to the more recent one, and they both target the most critically ill patients in septic shock. In addition, recent data have shown that immunosuppression in ICU, also known as delayed-injury acquired immunodeficiency, is present in subgroups of severely injured patients, in both septic and non-septic patients (Venet et al., 2022). Therefore, this study provides an opportunity to discuss an example of the use of

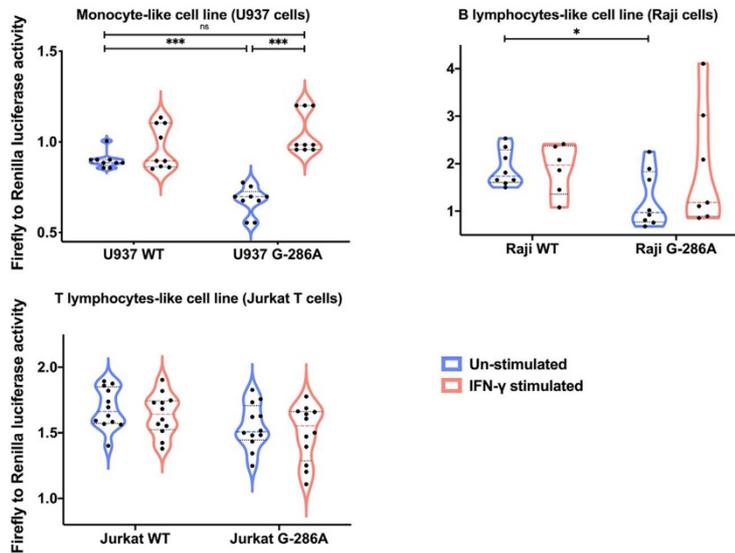


Figure 4. In vitro transient transfection of U937, Raji and Jurkat T cells with *CIITA* pIII luciferase reporting plasmid
Transfected cells were stimulated during 6h with IFN- γ . *CIITA* promoter III activity is represented by Firefly to Renilla luciferase activity over empty vector. Results are presented as violin plot, truncated for Raji cells, with median and quartiles lines. WT, WildType. p values were calculated using Mann-Whitney Test. ***p < 0.001 and *p < 0.05.

genetic biomarker through the understanding of the underlying immune mechanism, which can be used in all severe ICU patients.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Study design and setting
 - Healthy human control samples
 - Cell lines
- METHOD DETAILS
 - Genotyping
 - Flow cytometry to assay mHLA-DR
 - mHLA-DR expression upon exposure to IFN- γ
 - Total RNA isolation and quantitative PCR analysis
 - Transfection and plasmid and dual-luciferase reporter assays
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105291>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sergio Crovella (Department of Advanced Diagnostics, Institute for Maternal and Child Health-IRCCS 'Burlo Garofolo', Trieste, Italy and Department of Medical, Surgical and Health Sciences, University

of Trieste, Trieste, Italy) for help with paper revisions. The study was supported by a BQR "Bonus Qualité Recherche" grant from the University Paris Sud to P.T.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Investigation, J.M., M.B., S.H., K.Z.M., C.B., V.F., A.C.L., and D.P.; Formal analysis and Visualization, J.M., M.J.C., M.B., and P.T.; Conceptualization and Methodology, J.M., M.B., P.T., D.P. and A.C.L.; Writing – Original Draft, J.M., P.T., and M.B.; Writing – Review and Editing, J.M., P.T., M.J.C., and M.B.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: July 4, 2022

Revised: September 5, 2022

Accepted: October 3, 2022

Published: November 18, 2022

REFERENCES

- Abraham, E., Laterre, P.-F., Garg, R., Levy, H., Talwar, D., Trzaskoma, B.L., François, B., Guy, J.S., Brückmann, M., Rea-Neto, A., et al.; Administration of drotrecogin alfa (activated) in early stage severe sepsis (ADDRESS) study group (2005). Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N. Engl. J. Med.* 353, 1332–1341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050935>.
- Antcliffe, D.B., Burnham, K.L., Al-Beidh, F., Santhakumaran, S., Brett, S.J., Hinds, C.J., Ashby, D., Knight, J.C., and Gordon, A.C. (2019). Transcriptomic signatures in sepsis and a differential response to steroids. From the VANISH randomized trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 199, 980–986. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1419OC>.
- Bronson, P.G., Criswell, L.A., and Barcellos, L.F. (2008). The MHC2TA -168A/G polymorphism and risk for rheumatoid arthritis: a meta-analysis of 6861 patients and 9270 controls reveals no evidence for association. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 933–936. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.077099>.
- Casanova, J.-L., and Abel, L. (2007). Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science* 317, 617–619. <https://doi.org/10.1126/science.1142963>.
- Conway Morris, A., Datta, D., Shankar-Hari, M., Stephen, J., Weir, C.J., Rennie, J., Antonelli, J., Bateman, A., Warner, N., Judge, K., et al. (2018). Cell-surface signatures of immune dysfunction risk-stratify critically ill patients: INFECT study. *Intensive Care Med.* 44, 627–635. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5247-0>.
- Demaret, J., Walencik, A., Jacob, M.-C., Timsit, J.-F., Venet, F., Lepape, A., and Monneret, G. (2013). Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin. Cytometry* 84B, 59–62. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21043>.
- Döcke, W.D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., Volk, H.D., and Kox, W. (1997). Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med.* 3, 678–681. <https://doi.org/10.1038/nm0697-678>.
- Eichacker, P.Q., Parent, C., Kalil, A., Esposito, C., Cui, X., Banks, S.M., Gerstenberger, E.P., Fitz, Y., Danner, R.L., and Natanson, C. (2002). Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1197–1205. <https://doi.org/10.1164/rccm.200204-302OC>.
- Eike, M.C., Skinningsrud, B., Ronninger, M., Stormy, A., Kvien, T.K., Jøner, G., Njølstad, P.R., Førre, O., Flatø, B., Alfredsson, L., et al. (2012). CIITA gene variants are associated with rheumatoid arthritis in Scandinavian populations. *Genes Immun.* 13, 431–436. <https://doi.org/10.1038/gene.2012.11>.
- Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C.M., French, C., Machado, F.R., McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, H.C., et al. (2021). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med.* 47, 1181–1247. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06506-y>.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47–50.
- Fairfax, B.P., Humburg, P., Makino, S., Naranbhai, V., Wong, D., Lau, E., Jostins, L., Plant, K., Andrews, R., McGee, C., and Knight, J.C. (2014). Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression. *Science* 343, 1246949. <https://doi.org/10.1126/science.1246949>.
- Fang, F., Zhang, Y., Tang, J., Lunsford, L.D., Li, T., Tang, R., He, J., Xu, P., Faramand, A., Xu, J., and You, C. (2019). Association of corticosteroid treatment with outcomes in adult patients with sepsis: a systematic Review and meta-analysis. *JAMA Intern. Med.* 179, 213–223. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.5849>.
- Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N.K.J., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., and Reinhart, K.; International forum of acute care trialists (2016). Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 259–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>.
- Ghosh, N., Piskurich, J.F., Wright, G., Hassani, K., Ting, J.P.-Y., and Wright, K.L. (1999). A novel element and a TEF-2-like element activate the major histocompatibility complex class II transactivator in B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 32342–32350. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32342>.
- Harrison, P., Pointon, J.J., Farrar, C., Harin, A., and Wordsworth, B.P. (2007). MHC2TA promoter polymorphism (-168*G/A, rs3087456) is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in British Caucasian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 46, 409–411. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei300>.
- Hornell, T.M.C., Beresford, G.W., Bushey, A., Boss, J.M., and Mellins, E.D. (2003). Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* 171, 2374–2383. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2374>.
- Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 862–874. <https://doi.org/10.1038/nri3552>.
- Kernan, K.F., Ghaloul-Gonzalez, L., Shakoory, B., Kellum, J.A., Angus, D.C., and Carrillo, J.A. (2019). Adults with septic shock and extreme hyperferritinemia exhibit pathogenic immune variation. *Genes Immun.* 20, 520–526. <https://doi.org/10.1038/s41435-018-0030-3>.
- Leentjens, J., Kox, M., Koch, R.M., Preijers, F., Joosten, L.A.B., van der Hoeven, J.G., Netea, M.G., and Pickkers, P. (2012). Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 838–845. <https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0645OC>.
- Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.-L., and Ramsay, G. (2003). SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Crit. Care Med.* 31, 1250–1256. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B>.

- Liu, H., and Naismith, J.H. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.* 8, 91. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-91>.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lohsen, S., Majumder, P., Scharer, C.D., Barwick, B.G., Austin, J.W., Zinzow-Kramer, W.M., and Boss, J.M. (2014). Common distal elements orchestrate CIITA isoform-specific expression in multiple cell types. *Genes Immun.* 15, 543–555. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.49>.
- Lukaszewicz, A.-C., Favre, V., and Payen, D. (2010). Is monocyte HLA-DR expression monitoring a useful tool to predict the risk of secondary infection? *Minerva Anestesiol.* 76, 737–743.
- Lukaszewicz, A.-C., Grienen, M., Resche-Rigon, M., Pirracchio, R., Favre, V., Boval, B., and Payen, D. (2009). Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit. Care Med.* 37, 2746–2752. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181ab858a>.
- Mach, B., Steimle, V., and Reith, W. (1994). MHC class II-deficient combined immunodeficiency: a disease of gene regulation. *Immunol. Rev.* 138, 207–221. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1994.tb00853.x>.
- Minneci, P.C., Deans, K.J., Eichacker, P.Q., and Natanson, C. (2009). The effects of steroids during sepsis depend on dose and severity of illness: an updated meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 308–318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02752.x>.
- Monneret, G., Lepape, A., Voirin, N., Bohé, J., Venet, F., Debar, A.-L., Thizy, H., Bienvenu, J., Gueyffier, F., and Vanhems, P. (2006). Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 32, 1175–1183. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0204-8>.
- Nguyen, L.S., Ait Hamou, Z., Gastli, N., Chapuis, N., and Pène, F. (2021). Potential role for interferon gamma in the treatment of recurrent ventilator-acquired pneumonia in patients with COVID-19: a hypothesis. *Intensive Care Med.* 47, 619–621. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06377-3>.
- Ni, Z., Abou El Hassan, M., Xu, Z., Yu, T., and Bremner, R. (2008). The chromatin-remodeling enzyme BRG1 coordinates CIITA induction through many interdependent distal enhancers. *Nat. Immunol.* 9, 785–793. <https://doi.org/10.1038/ni.1619>.
- Nozell, S., Ma, Z., Wilson, C., Shah, R., and Benveniste, E.N. (2004). Class II major histocompatibility complex transactivator (CIITA) inhibits matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J. Biol. Chem.* 279, 38577–38589. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403738200>.
- Payen, D., Favre, V., Miatello, J., Leentjens, J., Brumpt, C., Tissières, P., Dupuis, C., Pickkers, P., and Lukaszewicz, A.C. (2019). Multicentric experience with interferon gamma therapy in sepsis induced immunosuppression. A case series. *BMC Infect. Dis.* 19, 931. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4526-x>.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., and Sham, P.C. (2007). PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575.
- Quintana-Murci, L. (2019). Human immunology through the lens of evolutionary genetics. *Cell* 177, 184–199. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.033>.
- Reinhart, K., Daniels, R., Kissoon, N., Machado, F.R., Schachter, R.D., and Finfer, S. (2017). Recognizing sepsis as a global health priority — a WHO resolution. *N. Engl. J. Med.* 377, 414–417. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1707170>.
- Reith, W., LeibundGut-Landmann, S., and Waldburger, J.-M. (2005). Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 793–806. <https://doi.org/10.1038/nri1708>.
- Shakoory, B., Carrillo, J.A., Chatham, W.W., Amdur, R.L., Zhao, H., Dinarello, C.A., Cron, R.Q., and Opal, S.M. (2016). Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of macrophage activation syndrome: reanalysis of a prior phase III trial. *Crit. Care Med.* 44, 275–281. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001402>.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Cooper-Smith, C.M., et al. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.
- Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M., and Mach, B. (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75, 135–146. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80090-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80090-X).
- Suffredini, A.F., and Munford, R.S. (2011). Novel therapies for septic shock over the past 4 decades. *JAMA* 306, 194–199. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.909>.
- Swanberg, M., Lidman, O., Padyukov, L., Eriksson, P., Akesson, E., Jagodic, M., Lobell, A., Khademi, M., Börjesson, O., Lindgren, C.M., et al. (2005). MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat. Genet.* 37, 486–494. <https://doi.org/10.1038/ng1544>.
- Ting, J.P.-Y., and Trowsdale, J. (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109, S21–S33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00696-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00696-7).
- Vasseur, E., Boniotto, M., Patin, E., Laval, G., Quach, H., Manry, J., Crouau-Roy, B., and Quintana-Murci, L. (2012). The evolutionary landscape of cytosolic microbial sensors in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.05.008>.
- Venet, F., and Monneret, G. (2018). Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* 14, 121–137. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.165>.
- Venet, F., Textoris, J., Blein, S., Rol, M.-L., Bodinier, M., Canard, B., Cortez, P., Meunier, B., Tan, L.K., Tipples, C., et al.; REALISM study group (2022). Immune profiling demonstrates a common immune signature of delayed acquired immunodeficiency in patients with various etiologies of severe injury. *Crit. Care Med.* 50, 565–575. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000005270>.
- Wang, J., Roderiquez, G., Jones, T., McPhie, P., and Norcross, M.A. (2007). Control of in vitro immune responses by regulatory oligodeoxynucleotides through inhibition of pIII promoter directed expression of MHC class II transactivator in human primary monocytes. *J. Immunol.* 179, 45–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.45>.
- Warren, H.S., Suffredini, A.F., Eichacker, P.Q., and Munford, R.S. (2002). Risks and benefits of activated protein C treatment for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1027–1030. <https://doi.org/10.1056/NEJMsb020574>.
- Wu, J.-F., Ma, J., Chen, J., Ou-Yang, B., Chen, M.-Y., Li, L.-F., Liu, Y.-J., Lin, A.-H., and Guan, X.-D. (2011). Changes of monocyte human leukocyte antigen-DR expression as a reliable predictor of mortality in severe sepsis. *Crit. Care* 15, R220. <https://doi.org/10.1186/cc10457>.
- Xue, Y., Tang, D., Li, S.-J., Zhou, J., Hsueh, C.-Y., Zhao, D.-D., Heng, Y., Tao, L., and Lu, L.-M. (2020). Link between CIITA rs3087456 polymorphism and the risk of laryngeal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Pathol. Res. Pract.* 216, 152793. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152793>.
- Ziegler, E.J., Fisher, C.J., Sprung, C.L., Straube, R.C., Sadoff, J.C., Foulke, G.E., Wortel, C.H., Fink, M.P., Dellinger, R.P., and Teng, N.N. (1991). Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 324, 429–436. <https://doi.org/10.1056/NEJM199102143240701>.
- Zinzow-Kramer, W.M., Long, A.B., Youngblood, B.A., Rosenthal, K.M., Butler, R., Mohammed, A.-U.-R., Skountzou, I., Ahmed, R., Evavold, B.D., and Boss, J.M. (2012). CIITA promoter I CARD-deficient mice express functional MHC class II genes in myeloid and lymphoid compartments. *Genes Immun.* 13, 299–310. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.86>.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Quantibrite Anti-Human HLA-DR PE/Monocyte PerCP-Cy™5.5	BD Biosciences	Cat#340827; RRID: AB_400137
PE Phycoerythrin Fluorescence Quantitation Kit	BD Biosciences	Cat#340495; RRID: AB_2868736
CD20 Antibody, anti-human, FITC	Miltenyi Biotec	Cat#130-113-373; RRID: AB_2726142
PE Mouse Anti-Human CD14	BD Biosciences	Cat#347497; RRID: AB_400312
Fc Receptor Binding Inhibitor Polyclonal Antibody, eBioscience™	Thermo Fisher Scientific	Cat#14-9161-73; RRID: AB_468582
PE Mouse Anti-Human CD14	BD Biosciences	Cat#555398; RRID: AB_395799
PE-Cy™7 Mouse Anti-Human HLA-DR	BD Biosciences	Cat#560651; RRID: AB_1727528
Biological samples		
Blood sample from adult patient	Critical Care Unit of the Department of Anesthesiology, Lariboisière University Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, France	Cochin Hospital Ethics Committee (# CCPPRB 2061)
Blood sample from healthy blood donors	French national blood collection center (Etablissement Français du Sang, EFS)	N/A
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Recombinant Human Interferon Gamma (rh IFN-gamma)	ImmunoTools	Cat#11343537
Critical commercial assays		
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad	Cat#1708891
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega	E2940
SNP Genotyping Analysis Using TaqMan Assays	ThermoFisher Scientific	N/A
TurboFect Transfection Reagent	ThermoFisher Scientific	Cat#R0531
Deposited data		
FHU Sepsis: personalized interventions	This paper	https://www.fhu-sepsis.uvsq.fr
Experimental models: Cell lines		
U-937	ATCC	CRL-15932
Raji	ATCC	CCL-86
Oligonucleotides		
SNP genotyping; CIITA-P3 SNP-712 Taqman probe: ATGGGAGTCAGTATTATTTAGCATC[A/G]CTTTGG CGGGTCACCCCAACCATC	This paper	N/A
SNP genotyping; CIITA-P3 SNP-286 Taqman probe: GAAGTGAAATTAATTTAGAGGTGT[A/G]GGGAG GGCTTAAGGGAGTGTGGTAA	This paper	N/A
QPCR CIITA isoforms; Promoter1 f: CATGGTGGCAGCTCAC	This paper	N/A
QPCR CIITA isoforms; Promoter3 f: CCCAAGGCAGCTCACA	This paper	N/A
QPCR CIITA isoforms; Promoter4 f: GAACAGCGGCAGCTCA	This paper	N/A

(Continued on next page)



Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
QPCR CIITA isoforms; Exon2 r: GTAGCCACCTTCTAGGG	This paper	N/A
HuRPLP03 f: AGGCTTTAGGTATCACCCTAA	This paper	N/A
HuRPLP03 r: ACATCACTCAGGATTTCAATGG	This paper	N/A
Recombinant DNA		
pGL3 Luciferase Reporter Vectors	Promega	E1761
pRL <i>Renilla</i> Luciferase Control Reporter Vectors TK	Promega	E2241
pRL <i>Renilla</i> Luciferase Control Reporter Vectors no promoter	Promega	E2271
Software and algorithms		
Arlequin ver 3.11	Excoffier and Schneider, 2005	http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/
PLINK	Purcell et al., 2007	https://zzz.bwh.harvard.edu/plink/
Stata	Stata Corp, 2016	https://www.stata.com
GraphPad Prism version 9.0	GraphPad Software	www.graphpad.com
FlowJo	BD Life Sciences	https://www.flowjo.com/solutions/flowjo
Beacon Designer 7.0	PREMIER Biosoft	http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/
Other		
One-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol	Liu and Naismith, 2008	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19055817/

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Pierre Tissieres (pierre.tissieres@i2bc.paris-saclay.fr).

Materials availability

- This study did not generate new unique reagents.
- Plasmids generated in this study have not been deposited.

Data and code availability

Data reported in this paper will be shared by the [lead contact](#) upon request. This article does not report original code. Any additional information required to reanalyze the data reported in this article is available from the [lead contact](#) on request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Study design and setting

This was a single center observational study with sequential recruitment of patients admitted in the Critical Care Unit of the Department of Anesthesiology, Lariboisière University Hospital, Paris, France, between February 2004 and November 2005. The study was approved by the Cochin Hospital Ethics Committee (# CCPPRB, 2061), Assistance Publique Hôpitaux de Paris. Patients were screened at admission by attending intensive care physicians for the inclusion criteria: presence of septic shock ([Levy et al., 2003](#)) and age ≥ 18 years. There were no exclusion criteria. Eligible patients (or their representatives) gave informed written consent for the study. Clinical and biological characteristics were prospectively collected from recruited patients, including demographic characteristics, severity scores (SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II and SOFA: Sequential Organ Failure Assessment), infection foci, baseline health status



and medications and routinely measured laboratory markers. Peripheral blood was sampled into EDTA anticoagulants tubes (Vacutainer, Becton Dickinson, USA) at days 1, 2, 7, 14, 21 and 28 following ICU admission for mHLA-DR assays, and upon recruitment to the study for genotyping. Of 221 patients with septic shock recruited to the study, daily data from day of ICU admission to ≥ 7 days and genomic DNA was available from 203 patients (Figure S1). The median age of the study cohort was 61 years (range: 18-94), with a majority of men (65%) (Table 1).

Healthy human control samples

For *ex vivo* and *in vitro* experiments, peripheral blood from healthy blood donors were collected at the French national blood collection center (*Etablissement Français du Sang, EFS*) following written informed consent was obtained from healthy volunteers.

Cell lines

Human leukemic monocyte lymphoma cell line U937 and human Burkitt's lymphoma cells (Raji) were cultured in RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1.0 mM sodium pyruvate, amino acids, 20 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin at 37°C in 5% CO₂.

METHOD DETAILS

Genotyping

Genotyping was performed blinded to the clinical data. Genomic DNA (gDNA) was extracted from 200 μL of peripheral whole blood using the NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) following manufacturer's instruction. Presence of two SNPs: G-286A*rs3087456 and G-712A*rs12596540 located on the *CIITA* pIII was assessed using commercially available TaqMan assays (Life Technologies, La Jolla, CA) to discriminate between the two SNPs (Table S1). Real time allelic discrimination assays were performed using SsoFast Probes Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) and a CFX-96 real-time PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA). Genotyping was performed blinded to the clinical data. Genomic DNA concentration was measured (NanoDrop, 2000 spectrophotometer, ThermoFisher, Waltham, MA) and quality assessed (260/280 ratio between 1.7 and 1.9).

Flow cytometry to assay mHLA-DR

Quantification of mHLA-DR on circulating monocytes from patients with sepsis was performed using a standardized flow cytometry assay (Demaret et al., 2013). Anticoagulated whole blood was stained with antibodies to HLA-DR and CD14 mixture (QuantiBrite anti-HLA-DR PE/anti-monocyte CD14 PerCP-Cy5.5, Becton Dickinson, CA), prior to lysis, washing, and acquiring of HLA-DR expression on monocytes using BD FACSCanto (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). To quantify, the median fluorescence intensity of the entire monocyte population was then transformed to number of antibodies per cell (AB/C) using calibrated PE beads (BD QuantiBRITE PE BEADS, Becton-Dickinson San Jose, CA). Results were analyzed using FlowJo (TreeStar Inc, Ashland, OR) and mixed with calibrated PE beads (BD Quantibrite PE BEADS, Becton Dickinson, CA).

mHLA-DR expression upon exposure to IFN- γ

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy volunteers were isolated by Ficoll density-gradient centrifugation. B cells and monocytes from blood donors were isolated using positive selection with MS columns and the CD19 and CD14 Microbeads kits, respectively (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) following manufacturer's protocols. Purity was assessed by flow cytometry, using anti-CD20-FITC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and anti-CD14-PE (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Isolated cells had an average purity of 90% ($\pm 8\%$).

For analysis of healthy donors' blood, isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), monocytes and B cells were washed once in PBS. After being washed once in cold PBS, cells were incubated at 4°C for 15' with the Human Fc Receptor Binding Inhibitor (eBioscience, San Diego, CA) to avoid unspecific binding of labeled antibodies. Cells were then incubated with fluorescently labeled antibodies were added for 15min at 4°C. The antibodies mix contained: Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD20 (mouse monoclonal IgG1 κ , clone LT20, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD14 (mouse monoclonal IgG2 α , κ , clone M5E2, BD Biosciences, Franklin Lakes NJ) and PE-cyanine 7 (PE-Cy7)-conjugated anti-HLADR (mouse monoclonal IgG2 α , κ , clone G46-6, BD



Biosciences, Franklin Lakes, NJ). After two PBS washes, cells were suspended in 1% paraformaldehyde. Flow cytometry was performed on a BD FACSCanto (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and results analyzed by the software FlowJo (TreeStar Inc, Ashland, OR).

PBMCs were cultured in 24-well plates at 2×10^6 cells/ml in RPMI with 10% FBS at 37°C, 5% CO₂. Isolated CD14⁺ cells were cultured at 2.5×10^5 in 24-well plates in DMEM with 5% FBS at 37°C, 5% CO₂. Isolated CD19⁺ cells were cultured at 10^5 cells in 96-well plates in RPMI 10% FBS at 37°C, 5% CO₂. Cultured cells were incubated in the presence or absence of 50 UI/ml of human recombinant IFN- γ (ImmunoTools, Friesoythe, Germany). After 6 h, CD14⁺ and CD19⁺ cells were harvested for RNA extraction, whilst after 24 h, PBMCs were collected for flow cytometry analysis.

Total RNA isolation and quantitative PCR analysis

Total RNA was isolated from monocytes and B cells using the NucleoSpin® RNA XS (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), following manufacturer's instruction. cDNA was generated from 200 ng of total RNA using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Primers for each CIITA isoform and for the large subunit of ribosomal protein (RPLPO), were designed using the software Beacon Designer 7.0 (PREMIER Biosoft, Palo Alto, CA) and are reported in together with working concentrations and amplification efficiencies (Table S1). RPLPO was used as a reference gene and the relative quantity of the transcript was calculated by the 2- $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001). PCR reactions were performed in a CFX96 real time PCR system (Bio-Rad Hercules, CA) using the SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA).

Transfection and plasmid and dual-luciferase reporter assays

Four $\times 10^5$ cells (Human leukemic monocyte lymphoma cell line U937 and human Burkitt's lymphoma cells Raji) were transfected with 1 μ g of reporter plasmid and 10 η g of pRL Renilla luciferase vector (Promega, Madison, WI) using Turbofect™ Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Waltham, MA). After transfection, the cells were incubated for 30 h and stimulated by 50 UI/ml rIFN- γ (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) for 6h or left untreated.

The 1200 bp of the pIII promoter of MHCIIA was cloned in pGL-3 firefly luciferase reporter vector (Promega, Madison, WI). SNPs G-286A*rs3087456 and G-712A*rs12596540 were inserted by using site-specific mutagenesis following published protocols (Stratagene, La Jolla, CA) (Liu and Naismith, 2008). All the inserts were verified by Sanger sequencing. Dual-Luciferase assay was performed with the Dual-Glo Luciferase Assay (Promega, Madison, WI), following manufacturer's instructions. Firefly and Renilla luciferase substrates fluorescence was recorded by a Tri-Star LB 941 (Berthold Technologies, Willbad, Germany). As an internal control, pRL-TK, expressing the Renilla luciferase under the control of the constitutive TK promoter was co-transfected (Promega, Madison, WI). Results are represented by the mean value and the standard deviation and are expressed as relative luciferase activity (ratio of firefly luciferase activity to renilla luciferase activity). To confirm the results, experiments were performed in triplicates and each one was carried out three times.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Allele and genotype frequencies were calculated by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium for the two SNPs was assessed by the software Arlequin v3.11. Analysis of association between genotype and binomial clinical outcomes using different genetic models was performed by using the software plink (<http://pangu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

Results are presented as range and median for continuous variables and as proportion of total for categorical variables. Differences in HLA-DR, SOFA and SAPS II scores for the different genotypes were analyzed by using the Kruskal-Wallis test run in Stata software. The Wilcoxon rank-sum test was applied to analyze continuous variables between different genotypes. Mann-Whitney Test was applied for analysis of luciferase experiments by using the software GraphPad Prism 9.0. p values <0.05 were considered significant.

3 Validation de la mesure de l'expression de mHLA-DR par cytométrie de flux sans lyse ni lavage au chevet du patient avec un faible volume de sang total

3.1 Contexte

La mesure de l'expression HLA-DR sur les monocytes par cytométrie de flux semble être un marqueur fort de l'immunosuppression chez les patients des unités de soins intensifs. La persistance d'une expression faible de mHLA-DR est associée à un risque accru d'infections nosocomiales et de mortalité. Afin d'adapter cette technique aux exigences pédiatriques et de permettre un accès étendu 24h/24 et 7j/7, nous avons développé une méthode au chevet du patient (Bedside Method : BM) nécessitant un faible volume de sang frais.

3.2 Description de l'étude

L'objectif est de comparer l'expression quantitative de mHLA-DR par cytométrie de flux mesurée avec notre procédure avec la méthode standardisée (Standard Method : SM). HLA-DR monocyttaire a été quantifié avec les deux méthodes : SM dans un laboratoire d'hématologie clinique avec une méthode standardisée de cytométrie de flux, et BM dans notre unité de soins intensifs pédiatriques. En bref, pour la BM, seulement 10 μ L de sang frais ont été incubés avec 4 μ L du QuantiBRITE® Anti HLA-DR-PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5. Afin de ne pas compromettre l'acquisition des données, mHLA-DR a été mesuré immédiatement en utilisant un protocole no-lyse no-wash avec le cytomètre Attune®, disponible dans notre service. L'intensité de fluorescence moyenne a été convertie en anticorps par cellule (AB/C), calibrée avec les billes Quantibrite™ PE.

3.3 Résultats et conclusion

Nous avons déterminé l'expression de mHLA-DR chez 34 patients sur une période de 3 semaines, 20 adultes et 14 enfants admis en soins intensifs. La corrélation entre BM et SM était excellente (corrélation de Pearson : $y = 0,8192x + 678,7$, $r = 0,9270$, $p < 0,0001$). Notre méthode BM de mesure de l'expression mHLA-DR permet donc une préparation simplifiée des échantillons avec un très petit volume de sang, sans compromettre les données. Elle est disponible immédiatement au chevet du patient avec un temps d'acquisition rapide et présente une corrélation avec la méthode standardisée. Cette méthode pourrait être utilisée pour étudier l'immunoparalysie dans le sepsis néonatal.



Author Dashboard

- 1 Submitted Manuscripts >
- 1 Manuscripts with Decisions >
- [Start New Submission](#) >
- [Legacy Instructions](#) >
- 5 Most Recent E-mails >
- [Before You Submit](#) >

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ME: Regal, Doris	22-077	Bedside no-lyse no-wash whole blood microvolume measurement of monocyte HLA-DR by flow cytometry View Submission	03-Oct-2022	03-Oct-2022
<ul style="list-style-type: none">With Associate Editor				
Contact Journal				



**Bedside no-lyse no-wash whole blood microvolume
measurement of monocyte HLA-DR by flow cytometry**

Journal:	<i>Cytometry: Part B - Clinical Cytometry</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Miatello, Jordi; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Faivre, Valérie; Assistance Publique - Hopitaux de Paris Marais, Clémence; Assistance Publique - Hopitaux de Paris Payen, Didier; Assistance Publique - Hopitaux de Paris Tissières, Pierre; Institute for Integrative Cell Biology
Controlled Key Words:	Flow Cytometry, Immune monitoring, inflammation, Monocytes, Quantification, sepsis
Key Words:	Sepsis, Immunosuppression, mHLA-DR, Flow cytometry

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Bedside no-lyse no-wash whole blood microvolume measurement of monocyte HLA-DR**
4
5 **by flow cytometry**
6
7
8
9

10 Jordi Miatello^{1,2,3}, Valérie Faivre^{4,5}, Clémence Marais^{1,2,3}, Didier Payen⁶, Pierre Tissières^{1,2,3,*}
11
12
13

14 ¹ Institute of Integrative Biology of the Cell, CNRS, CEA, Paris-Saclay University, Gif-sur-
15 Yvette, France
16
17

18 ² Paediatric Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP, Paris-Saclay University, Bicêtre
19 Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France
20
21

22 ³ FHU Sepsis, AP-HP, Paris-Saclay University, INSERM, Le Kremlin-Bicêtre, France
23
24

25 ⁴ INSERM UMR1141 Neurodiderot, Université Paris Cité, France
26
27

28 ⁵ Saint-Louis Lariboisière Hospital, AP-HP, Denis Diderot University, Paris, France
29
30

31 ⁶ Denis Diderot University, Paris, Sorbonne, Cité Paris, France
32

33 ***Corresponding author:** Pierre Tissières, MD, DSc
34
35 Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC)
36
37 (Paris-Saclay University, CEA, CNRS)
38
39 1 Avenue de la Terrasse
40
41 91190 Gif-sur-Yvette, France
42
43
44
45 Email : pierre.tissieres@i2bc.paris-saclay.fr
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Background: Monocyte HLA-DR expression appears to be a potent marker of immunosuppression in the intensive care unit patients. The persistence of low mHLA-DR expression is associated with an increased risk of nosocomial infections and mortality. To adapt this technique to paediatric requirements and provide extensive 24/7 access, we have developed a bedside method (BM) requiring a small volume of blood. The objective is to compare the expression of mHLA-DR by flow cytometry measured with our procedure with the standardised method (SM).

Methods: mHLA-DR was quantified with both methods: SM in a clinical haematology laboratory with standardised method according to manufacturer protocol, and BM using delocalized flow cytometer in our paediatric ICU. Briefly, for BM, 10 μ L of fresh blood was incubated with 4 μ L of the QuantiBRITE[®] Anti HLA-DR-PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5, anti-CD45 and anti-CD19 antibody. In order not to compromise data acquisition, mHLA-DR was measured immediately using a no-lyse no-wash protocol with the Attune[®] cytometer. The median fluorescence intensity was converted to antibodies per cell (AB/C), calibrated with the Quantibrite[™] PE Beads.

Results: We determined the expression of mHLA-DR in 34 patients, 20 adults and 14 children admitted to ICU. Correlation between BM and SM was excellent (Pearson's correlation: $y = 0.8192x + 678.7$, $r = 0.9270$, $p < 0.0001$).

Conclusions: The no-lyse no-wash whole blood microvolume method for measuring mHLA-DR expression allows for simplified sample preparation without compromising accuracy of the data. This method may simplify immune monitoring of critically ill patient by the deployment of point of care method.

Key words: mHLA-DR, sepsis, flow cytometry, immunosuppression

INTRODUCTION

Acquired immunosuppression is an increasingly reported syndrome in intensive care patients and is associated with both sepsis-induced mortality and increased risk of secondary infections (Hotchkiss, Monneret, et Payen 2013; Conway Morris et al. 2018; Lukaszewicz et al. 2009). Initially described as related to sepsis, it is a consequence of acute systemic inflammation irrespective of the underlying cause (Hotchkiss, Monneret, et Payen 2013). Consequently, therapies targeting the restoration of monocyte (m)HLA-DR level with IFN- γ or GM-CSF as gain interest in order to reverse acquired immunosuppression (Payen et al. 2019; Nguyen et al. 2021; Meisel et al. 2009). Although the characterisation of immunosuppression is still a matter of debate, decreased expression of HLA-DR, a MHC class II molecule required for antigen presentation to T cells on the cell surface of circulating monocytes, is widely recognized as a marker of acquired immunosuppression (W. D. Döcke et al. 1997; Lukaszewicz et al. 2009; Monneret et al. 2006) and has been proposed to screen patients and monitor response to immunomodulatory therapies (Lukaszewicz et al. 2009). Although the literature has shown that measuring mHLA-DR expression is reliable and reproducible (Demaret et al. 2013; Frugier et al. 2022; de Roquetaillade et al. 2022; Monneret et al. 2002; W.-D. Döcke et al. 2005), the use of this biomarker remains infrequent in clinical practice due to the use of flow cytometry, cost, unavailability at the patient's bedside, the need for technical expertise for sample preparation and the limited blood volume available for its measurement such in neonates.

In view of this, we have developed a no-lyse no-wash bedside method (BM) requiring micro volume of whole fresh blood. The objective of this study was to compare the quantitative expression of mHLA-DR by flow cytometry - measured with our protocol - with the standardised method (SM).

MATERIALS AND METHODS

Study design and setting

In this observational study with sequential recruitment, we included 34 patients between March and April 2016: 14 paediatric patients within the paediatric intensive care unit of Bicêtre Hospital, APHP. Université Paris-Saclay, France, and 20 adult patients in the intensive care unit of the department of anaesthesiology at Lariboisière Hospital, APHP. Nord Université Paris Cité, France. The study (French study classification: MR004) was approved by the local IRB and French Data Protection Authority.

Sampling

Patients

Over a 3-week period, patients admitted in either the adult surgical ICU (Lariboisière Hospital) or the paediatric and neonatal ICU (Bicêtre Hospital) with vascular access were sampled, regardless of the reason for admission. There was no exclusion criterion. For each patient, peripheral blood was collected in two EDTA anticoagulant tubes (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) for mHLA-DR expression measurements by both methods.

Laboratory methods

Flow cytometry to assay mHLA-DR: standard method (SM)

Quantification of mHLA-DR on circulating patient monocytes by SM was performed using the standardised flow cytometry assay, as described in the literature (Demaret et al. 2013), in a laboratory accredited for the measurement of mHLA-DR (clinical haematology department, Lariboisière Hospital). Briefly, 50 μ L of anticoagulated whole blood was stained with 20 μ L of anti-HLA-DR and CD14 antibodies mixture (QuantiBrite anti-HLA-DR PE/anti-monocyte CD14 PerCP-Cy5. 5, Becton Dickinson, CA) at room temperature for 30 min in dark, prior to

1
2
3 lysis, washing and acquisition of HLA-DR expression on monocytes using the BD FACS
4
5 Canto (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Quantification of mHLA-DR expression was
6
7 assessed using calibrated PE beads (BD QuantiBRITE™ PE BEADS, Becton-Dickinson San
8
9 Jose, CA) using the number of antibodies per cell (AB/C) by flow cytometry (FACS Canto II
10
11 instrument, FACS Diva software, Becton Dickinson, San Jose, CA) as previously described
12
13 (Lukaszewicz et al. 2009).
14
15

16
17
18
19 *Flow cytometry to assay mHLA-DR: bedside method (BM)*

20
21 Quantification of mHLA-DR on circulating patient monocytes by BM was performed in the
22
23 laboratory of the Paediatric Intensive Care Unit at Bicêtre Hospital. Ten µL of anticoagulated
24
25 fresh whole blood was stained with 4 µL of anti-HLA-DR and CD14 antibodies mixture
26
27 (QuantiBrite anti-HLA-DR PE/anti-monocyte CD14 PerCP-Cy5. 5, Becton Dickinson, CA), 1
28
29 µL of PB-labelled anti-CD19 (clone SJ45-C1, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA) and
30
31 1 µL of PO-labelled anti-CD45 (clone HI30, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA) at
32
33 room temperature for 15 min in dark. Stained samples were diluted in 2ml of PBS. A
34
35 fluorescence threshold was used to distinguish the white blood cell population from the much
36
37 more abundant red blood cell population. Data were acquired on the Attune® Acoustic
38
39 cytometer (Life Technologies, Carlsbad, CA) available in our unit with a collection rate of
40
41 500µL/minute, i.e., 4 min acquisition per sample. Leukocytes were first identified based on
42
43 the level of CD45 expression and side scatter. Then monocytes (CD14 positive CD19
44
45 negative) were gated out. Monocyte HLA-DR expression was finally measured on their
46
47 surface (mono-parametric histogram) as median of fluorescence intensity (MFI) related to the
48
49 HLA-DR positive monocytes (Figure 1). These results were then transformed to AB/C
50
51 (number of antibodies fixed per cell) using the response of calibrated PE-beads (BD
52
53 QuantiBRITE™ PE BEADS, Becton-Dickinson San Jose, CA). Quantification of mHLA-DR
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 expression was assessed using calibrated PE beads (using the number of antibodies per cell
4
5 (AB/C) by flow cytometry.
6
7
8
9

10 *Statistical analysis*

11
12 Correlations were evaluated using the Pearson's correlation coefficient and intra-class
13
14 correlation coefficients test. Simple linear regression was performed, and Pearson's
15
16 correlation coefficient (r) was computed to estimate the correlation between SM and BM.
17
18 Bland Altman plots were used to allow for the observation of possible systematic biases,
19
20 estimated by the average of the differences between two results (Bland et Altman 1986). In
21
22 this model, limits of agreements were defined as ± 1.96 standard deviation (SD). The
23
24 statistical analyses were performed using StatView 5.0 (SAS Institute Inc.) and Prism 9.0
25
26 (GraphPad software, LLC). *P* values < 0.05 were considered significant.
27
28
29
30
31
32

33 **RESULTS**

34
35 In the 34 patients studied, the average age was 7 years (min-max: 4 months-14 years) in the
36
37 paediatric group and 60 years (min-max: 30-94 years) in the adult group. The number of
38
39 monocytes to be analysed was set at 1500. Mean mHLA-DR value was 16163 AB/C (min-
40
41 max: 3654-35028); 17396 (min-max: 3847-35182) in the SM group, 14929 (min-max: 3462-
42
43 34875) in the BM group. We compared the mHLA-DR measurements of paired samples
44
45 stained using both the SM and the BM. We observed an excellent correlation between the two
46
47 methods (Pearson's correlation: $y = 0.8192x + 678.7$, $r = 0.9270$, $p < 0.0001$) (Figure 2, A).
48
49 The Bland-Altman difference plot also showed good agreement of the results (Figure 2, B).
50
51 The mean of the differences was 2467 AB/C, which is negligible in relation to the field of
52
53 measurement and clinical decision making. Two values close to 20000 AB/C were above the
54
55 limits of analytical agreement.
56
57
58
59
60

DISCUSSION

Hereby we show the excellent correlation between mHLA-DR results measured with both methods, one according to the standard protocol following product guidelines the other according to a no-lyse no-wash protocol using a 5-fold smaller volume of blood. To our knowledge, such an inter-laboratory evaluation on fresh clinical samples, comparing two staining protocols with two different flow cytometers using different technology (eg. BD FACS Canto, ThermoFisher Attune) has never been reported and outline the reproducibility of mHLA-DR measurement. Previously, several studies have already shown the robustness and comparability of the standardised technique. Inter-laboratory studies on different cytometers have validated the measurement (Demaret et al. 2013) and the conversion of MFI (Median Fluorescence Intensity) to AB/C (antibody per cell) using a straight line spread has ensured the comparison of results (W.-D. Döcke et al. 2005). Recently, the quality of the results has led teams to request accreditation for the measurement of mHLA-DR by flow cytometry and to allow its use in routine care (Frugier et al. 2022) and is recommended by experts (Hall et al. 2022).

The advantages of the BM protocol are multiple. Firstly, the simplification of the staining protocol with no-lyse no-wash analysis allows to maximize samples with no cell loss. Second the implementation of such protocol with a small footprint cytometer (Attune® Acoustic Focusing Cytometer) installed in an intensive care unit allows this test to be accessible at the bedside 24 hours a day, 7 days a week. A device dedicated solely to the measurement of mHLA-DR has recently been proposed. The Accellix system, a fully automated benchtop cytometer, required less blood volume (40 μ L), with no need for bedside sample preparation. However, one study of 139 patients showed poorer correlations before correction of the

1
2
3 algorithm (Pearson correlation (r^2) ranging from 0.71 to 0.97), or errors in the fluidic issue,
4
5 the authors concluding that validation in a larger cohort study was necessary to improve
6
7 reliability (Zouiouich et al. 2017). Thirdly, performing cell acquisition with a no-wash method
8
9 avoids the decrease in mHLA-DR expression, potentially leading to under-diagnosis of
10
11 immunosuppression (W.-D. Döcke et al. 2005). The theoretic risk of non-specific binding of
12
13 staining antibodies caused by the inflammation-induced increase in Fc gamma receptors in
14
15 unwashed blood sample is not suggested by our study (Demaret et al. 2013). Fourthly, the
16
17 validation of our protocol with a very low volume of blood (10 μ L) opens the field of research
18
19 in very low weight patients, neonates and preterm infants, in whom the frequency and severity
20
21 of sepsis are important (Shane, Sánchez, et Stoll 2017). Already, preliminary data show that
22
23 the persistence of decreased mHLA-DR expression in paediatric patients with septic shock
24
25 correlates with the occurrence of secondary infections (Remy, Kolev-Descamps, et al. 2018)
26
27 and mortality (Manzoli et al. 2016). Our study, open the possibility to perform larger study in
28
29 paediatric and neonatal population. Finally, our protocol makes it possible to divide by 5 the
30
31 quantity of antibodies mixture (QuantiBrite anti-HLA-DR PE/anti-monocyte CD14 PerCP-
32
33 Cy5. 5), thus reducing the costs for this analysis.
34
35
36
37
38
39
40
41

42 Our study has one methodologic limit. Samples were transferred between two hospital
43
44 delaying analysis. The design of our study may have attenuated the impact since sampled
45
46 were crossed analysed. Nevertheless, despite overall good agreement, high mHLA-DR
47
48 measurements were above the limits of analytical agreement with an absolute mean
49
50 differences of 2467 AB/C. Although negligible in view of clinically pertinent thresholds used
51
52 in intensive care (< 5000 AB/C indicating profound immunosuppression, and > 100000 AB/C
53
54 in favour of macrophage activation syndrome (Remy, Gossez, et al. 2018).
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CONCLUSION

The BM no-lyse no-wash protocol allows a reliable assessment of mHLA-DR expression with simplified sample preparation in a very low volume of fresh blood. This method could lead to the wider use of this biomarker in paediatric and neonatal intensive care units where sampling may be limited and opens the possibility of point of care monitoring of acquired immunosuppression status in critically patients.

For Peer Review

1
2
3 **REFERENCES**
4

5 Bland, J. M., et D. G. Altman. 1986. « Statistical Methods for Assessing Agreement between
6 Two Methods of Clinical Measurement ». *Lancet* (London, England) 1 (8476):
7 307-10.
8

9
10
11
12 Conway Morris, Andrew, Deepankar Datta, Manu Shankar-Hari, Jacqueline Stephen,
13 Christopher J. Weir, Jillian Rennie, Jean Antonelli, et al. 2018. « Cell-Surface
14 Signatures of Immune Dysfunction Risk-Stratify Critically Ill Patients: INFECT
15 Study ». *Intensive Care Medicine* 44 (5): 627-35. [https://doi.org/10.1007/s00134-018-](https://doi.org/10.1007/s00134-018-5247-0)
16 5247-0.
17
18

19
20
21
22 Demaret, Julie, Alexandre Walencik, Marie-Christine Jacob, Jean-François Timsit, Fabienne
23 Venet, Alain Lepape, et Guillaume Monneret. 2013. « Inter-Laboratory Assessment of
24 Flow Cytometric Monocyte HLA-DR Expression in Clinical Samples ». *Cytometry*
25 Part B: Clinical Cytometry 84B (1): 59-62. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21043>.
26
27

28
29
30
31 Döcke, W. D., F. Randow, U. Syrbe, D. Krausch, K. Asadullah, P. Reinke, H. D. Volk, et W.
32 Kox. 1997. « Monocyte Deactivation in Septic Patients: Restoration by IFN-Gamma
33 Treatment ». *Nature Medicine* 3 (6): 678-81. <https://doi.org/10.1038/nm0697-678>.
34
35

36
37
38
39 Döcke, Wolf-Dietrich, Conny Höflich, Kenneth A. Davis, Karsten Röttgers, Christian Meisel,
40 Paul Kiefer, Stefan U. Weber, et al. 2005. « Monitoring Temporary
41 Immunodepression by Flow Cytometric Measurement of Monocytic HLA-DR
42 Expression: A Multicenter Standardized Study ». *Clinical Chemistry* 51 (12): 2341-47.
43 <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.052639>.
44
45

46
47
48
49 Frugier, Audrey, Christophe Malcus, Maud Baume, Françoise Poitevin-Later, Anne-Claire
50 Lukaszewicz, Fabienne Venet, Guillaume Monneret, et Morgane Gossez. 2022.
51 « Accréditation de la mesure de l'expression des molécules HLA-DR à la surface des
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 monocytes (mHLA-DR) par cytométrie en flux ». *Annales De Biologie Clinique* 80
4
5 (2): 190-98. <https://doi.org/10.1684/abc.2022.1715>.
6
7
8 Hall, Mark W., Joseph A. Carcillo, Timothy Cornell, et Pediatric Organ Dysfunction
9
10 Information Update Mandate (PODIUM) Collaborative. 2022. « Immune System
11
12 Dysfunction Criteria in Critically Ill Children: The PODIUM Consensus
13
14 Conference ». *Pediatrics* 149 (1 Suppl 1): S91-98. [https://doi.org/10.1542/peds.2021-](https://doi.org/10.1542/peds.2021-052888N)
15
16 052888N.
17
18
19 Hotchkiss, Richard S., Guillaume Monneret, et Didier Payen. 2013. « Sepsis-Induced
20
21 Immunosuppression: From Cellular Dysfunctions to Immunotherapy ». *Nature*
22
23 *Reviews. Immunology* 13 (12): 862-74. <https://doi.org/10.1038/nri3552>.
24
25
26 Lukaszewicz, Anne-Claire, Marion Grienay, Matthieu Resche-Rigon, Romain Pirracchio,
27
28 Valérie Faivre, Bernadette Boval, et Didier Payen. 2009. « Monocytic HLA-DR
29
30 Expression in Intensive Care Patients: Interest for Prognosis and Secondary Infection
31
32 Prediction ». *Critical Care Medicine* 37 (10): 2746-52.
33
34 <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181ab858a>.
35
36
37
38 Manzoli, Talita Freitas, Eduardo Juan Troster, Juliana Ferreira Ferranti, et Maria Mirtes Sales.
39
40 2016. « Prolonged Suppression of Monocytic Human Leukocyte Antigen-DR
41
42 Expression Correlates with Mortality in Pediatric Septic Patients in a Pediatric
43
44 Tertiary Intensive Care Unit ». *Journal of Critical Care* 33 (juin): 84-89.
45
46 <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2016.01.027>.
47
48
49 Meisel, Christian, Joerg C. Schefold, Rene Psohowski, Tycho Baumann, Katrin Hetzger, Jan
50
51 Gregor, Steffen Weber-Carstens, et al. 2009. « Granulocyte-Macrophage Colony-
52
53 Stimulating Factor to Reverse Sepsis-Associated Immunosuppression: A Double-
54
55 Blind, Randomized, Placebo-Controlled Multicenter Trial ». *American Journal of*
56
57
58
59
60

1
2
3 Respiratory and Critical Care Medicine 180 (7): 640-48.

4
5 <https://doi.org/10.1164/rccm.200903-0363OC>.

6
7 Monneret, Guillaume, Nadia Elmenkouri, Julien Bohe, Anne-Lise Debard, Marie-Claude
8
9 Gutowski, Jacques Bienvenu, et Alain Lepape. 2002. « Analytical Requirements for
10
11 Measuring Monocytic Human Lymphocyte Antigen DR by Flow Cytometry:
12
13 Application to the Monitoring of Patients with Septic Shock ». *Clinical Chemistry* 48
14
15 (9): 1589-92.

16
17
18 Monneret, Guillaume, Alain Lepape, Nicolas Voirin, Julien Bohé, Fabienne Venet, Anne-Lise
19
20 Debard, Hélène Thizy, Jacques Bienvenu, François Gueyffier, et Philippe Vanhems.
21
22 2006. « Persisting Low Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR Expression Predicts
23
24 Mortality in Septic Shock ». *Intensive Care Medicine* 32 (8): 1175-83.
25
26 <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0204-8>.

27
28
29
30
31 Nguyen, Lee S., Zakaria Ait Hamou, Nabil Gastli, Nicolas Chapuis, et Frédéric Pène. 2021.
32
33 « Potential Role for Interferon Gamma in the Treatment of Recurrent Ventilator-
34
35 Acquired Pneumonia in Patients with COVID-19: A Hypothesis ». *Intensive Care*
36
37 *Medicine* 47 (5): 619-21. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06377-3>.

38
39
40 Payen, Didier, Valerie Faivre, Jordi Miatello, Jenneke Leentjens, Caren Brumpt, Pierre
41
42 Tissières, Claire Dupuis, Peter Pickkers, et Anne Claire Lukaszewicz. 2019.
43
44 « Multicentric Experience with Interferon Gamma Therapy in Sepsis Induced
45
46 Immunosuppression. A Case Series ». *BMC Infectious Diseases* 19 (1): 931.
47
48 <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4526-x>.

49
50
51 Remy, Solenn, Morgane Gossez, Alexandre Belot, Jack Hayman, Aurelie Portefaix, Fabienne
52
53 Venet, Etienne Javouhey, et Guillaume Monneret. 2018. « Massive Increase in
54
55 Monocyte HLA-DR Expression Can Be Used to Discriminate between Septic Shock
56
57
58
59
60

- 1
2
3 and Hemophagocytic Lymphohistiocytosis-Induced Shock ». *Critical Care* (London,
4 England) 22 (1): 213. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2146-2>.
5
6
7 Remy, Solenn, Karine Kolev-Descamps, Morgane Gossez, Fabienne Venet, Julie Demaret,
8 Etienne Javouhey, et Guillaume Monneret. 2018. « Occurrence of Marked Sepsis-
9 Induced Immunosuppression in Pediatric Septic Shock: A Pilot Study ». *Annals of*
10 *Intensive Care* 8 (1): 36. <https://doi.org/10.1186/s13613-018-0382-x>.
11
12
13
14
15
16
17 Roquetaillade, C. de, C. Dupuis, V. Faivre, A. C. Lukaszewicz, C. Brumpt, et D. Payen. 2022.
18 « Monitoring of Circulating Monocyte HLA-DR Expression in a Large Cohort of
19 Intensive Care Patients: Relation with Secondary Infections ». *Annals of Intensive*
20 *Care* 12 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/s13613-022-01010-y>.
21
22
23
24
25
26 Shane, Andi L., Pablo J. Sánchez, et Barbara J. Stoll. 2017. « Neonatal Sepsis ». *Lancet*
27 (London, England) 390 (10104): 1770-80. [https://doi.org/10.1016/S0140-](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31002-4)
28 [6736\(17\)31002-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31002-4).
29
30
31
32
33 Zouiouich, Mehdi, Morgane Gossez, Fabienne Venet, Thomas Rimmelé, et Guillaume
34 Monneret. 2017. « Automated Bedside Flow Cytometer for MHLA-DR Expression
35 Measurement: A Comparison Study with Reference Protocol ». *Intensive Care*
36 *Medicine Experimental* 5 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/s40635-017-0156-z>.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Figures titles and legend**
4
5
6

7
8 **Figure 1. Gating strategy for mHLA-DR measurements**
9

10 Identification of leukocytes on the level of CD45 and side scatter than gating on monocytes
11 and lymphocytes (A). Identification of monocytes based on CD14^{pos} CD19^{neg} (B).
12
13
14 Measurement of the MFI on their surface in relation to HLA-DR pos monocyte population.
15
16
17

18
19 **Figure 2. Comparison between SM and BM measurement of mHLA-DR expressed as**
20 **number of antibodies bound per cell (AB/C)**
21

22
23
24 Linear regression with 95% confidence bands of the best-fit line (A). Pearson's correlation
25 coefficient $r = 0.9270$; Bland Altman plots showing agreement between SM and BM (B).
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1

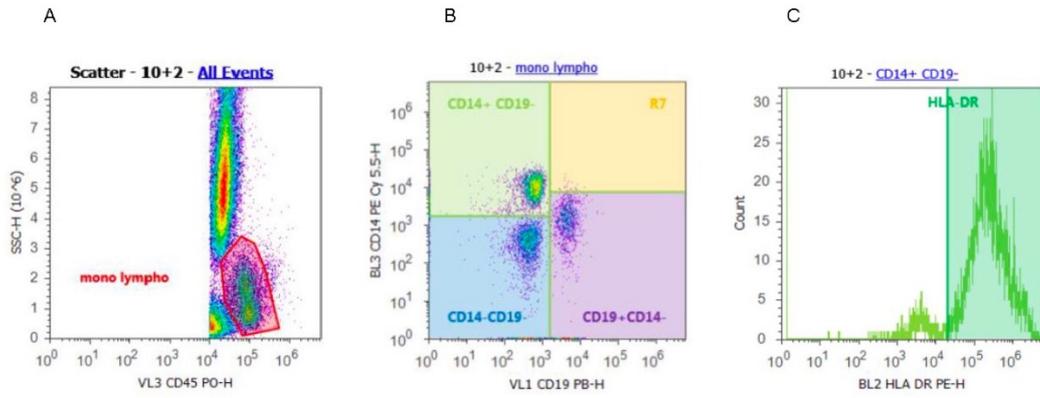
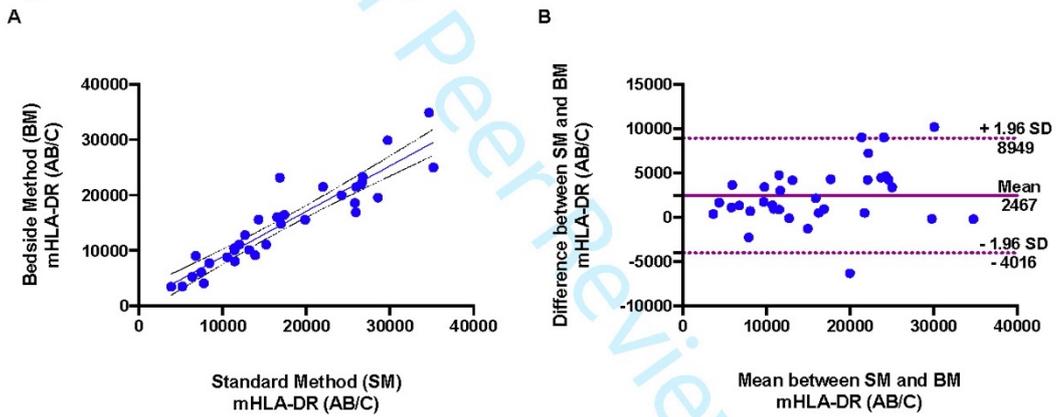


Figure 2



DISCUSSION

Malgré les progrès dans la prise en charge du choc septique grâce à la rédaction et l'application de recommandations internationales (Evans *et al.* 2021), le sepsis demeure une cause importante de morbi-mortalité dans le monde (Fleischmann *et al.* 2016). Lors du choc septique, la réponse immunitaire initiale est caractérisée par une réponse inflammatoire importante, responsable de l'état de choc, associée à l'apparition d'altérations du système immunitaire (Angus and van der Poll 2013). La durée et l'intensité de l'état d'immunosuppression qui peut en découler favorisent l'apparition d'infections nosocomiales secondaires et le risque de décès (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a). La compréhension des mécanismes de la réponse immunitaire des patients en état de choc septique est donc indispensable à l'amélioration de la prise en charge, individualisée et adaptée, grâce notamment aux possibilités de thérapies immunomodulatrices (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013b). De plus, afin de cibler au mieux les patients pouvant en bénéficier, l'amélioration des techniques de monitoring et l'étude détaillée des acteurs de la réponse immunitaire sont indispensables.

La présentation de l'antigène par les molécules du CMH de classe II est une étape primordiale de la réponse immunitaire. La diminution persistante de l'expression de l'une d'entre elles, HLA-DR, à la surface des monocytes, est actuellement considérée comme le reflet de l'état d'immunosuppression lié au sepsis (Monneret *et al.* 2004; Pachot *et al.* 2005b; Lukaszewicz *et al.* 2009). De plus, le transactivateur de classe II, CIITA, est le régulateur principal de l'expression des molécules du CMH-II : en l'absence de celui-ci, les cellules présentatrices d'antigènes n'expriment pas le CMH-II (León Machado and Steimle 2021). L'expression de CIITA est contrôlée au niveau transcriptionnel par un module de régulation hautement conservé qui se situe dans la région promotrice du gène (Reith, LeibundGut-Landmann and Waldburger 2005).

A partir de polymorphismes génétiques situés dans la région promotrice de *CIITA* et étudiés principalement dans les maladies inflammatoires (Swanberg *et al.* 2005), l'objectif principal de ce travail était de décrire l'impact de ces polymorphismes chez les patients en état de choc septique, ainsi que leurs rôles dans la présentation de l'antigène par HLA-DR et l'immunosuppression liée au

sepsis, et de proposer des hypothèses quant à leurs actions sur la régulation de l'expression de *CIITA*.

En parallèle, dans le cadre d'une recherche translationnelle, nous avons développé une technique rapide de monitoring de l'expression de mHLA-DR au lit du malade sur un faible volume de sang total frais (sans lyse ni lavage), et avons rapporté une expérience de traitement immunomodulateur par l'IFN- γ de patients adultes et pédiatriques atteints de chocs septiques sévères. Enfin, nous avons effectué deux études cliniques sur les cinétiques de mHLA-DR. Dans la première, nous avons étendu l'analyse de HLA-DR au phénotype monocyttaire chez des patients en sepsis, dans notre cas, hospitalisés pour COVID-19 sévère. Dans la seconde, nous allons décrire la cinétique des différents effecteurs cellulaires et marqueurs de réponses (protéines, transcrits) chez des patients pédiatriques en postopératoire de greffe hépatique, population à haut risque de développement d'infections secondaires.

1 Polymorphismes de *CIITA* : rôle et régulation d'une protéine indispensable à l'expression du CMH de classe II

Les molécules du CMH de classe II, présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, sont des protéines centrales de la réponse immunitaire à l'infection, et le transactivateur de classe II (*CIITA*) est indispensable à l'expression de celles-ci. De plus, l'expression membranaire du CMH-II à la surface des monocytes (mHLA-DR) est un des marqueurs les plus utilisés actuellement pour évaluer l'état d'immunosuppression lié au sepsis, pourvoyeur d'infections secondaires et de décès.

Dans l'étude que nous avons réalisée (présentée p. **Erreur ! Signet non défini.**, « **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** ») concernant deux polymorphismes génétiques situés dans le promoteur III de *CIITA*, nous avons montré que le polymorphisme G-286A*rs3087456 était associé à une augmentation de la mortalité à 28 jours en cas de choc septique, ainsi qu'à une diminution de la capacité à augmenter l'expression de mHLA-DR au cours de la durée d'hospitalisation en réanimation. De plus, *ex vivo*, le polymorphisme G-286A*rs3087456 altérait l'activité basale du promoteur pIII sans modifier l'expression des isoformes de pIII et pIV. Enfin, cette réduction d'activité du

promoteur III était entièrement récupérable après administration d'IFN- γ . La différence dans les profils d'induction entre l'activité du promoteur *in vitro* et l'expression des transcrits *ex vivo* suggérait que l'IFN- γ pouvait agir comme un inducteur transcriptionnel chez les patients porteurs du polymorphisme G-286A*rs3087456, où l'effet apparaît à un niveau post-transcriptionnel.

Finalement, notre travail fournissait deux informations importantes : premièrement, il démontrait qu'une susceptibilité génétique affectant le régulateur principal du CMH de classe II, CIITA, était associée à une expression défectueuse de mHLA-DR chez les patients présentant un choc septique, ainsi qu'une issue sombre. Cette susceptibilité, une fois détectée, permettrait de diagnostiquer un risque plus élevé d'immunosuppression induite par le sepsis. Deuxièmement, la démonstration de l'effet de l'IFN- γ sur la restauration de la conséquence fonctionnelle de ce génotype, suggérait que l'utilisation de ce biomarqueur génétique permettrait d'identifier les patients qui pourraient bénéficier d'un traitement immunomodulateur à base d'IFN- γ . Nous avons donc rapporté que le génotype G-286A*rs3087456 GG de *CIITA* était associé à une expression altérée de mHLA-DR dans le choc septique, prédictif du développement d'une immunosuppression persistante, et avons démontré l'effet de l'IFN- γ pour restaurer l'expression altérée du CMH de classe II.

1.1 Polymorphismes et réponse au sepsis : cas particulier des SNP de CIITA

L'utilisation de mHLA-DR pour évaluer le risque d'infection secondaire après un choc septique est bien admise (Lukaszewicz, Faivre and Payen 2010; Wu *et al.* 2011). L'utilisation d'un seuil inférieur à 8000 AB/C pour définir une expression fortement diminuée de mHLA-DR et permettre le diagnostic d'immunosuppression acquise gagne en crédibilité, en particulier si cette expression basse se prolonge au-delà du troisième jour après l'admission (Monneret *et al.* 2006; Payen *et al.* 2019). Nous avons montré dans notre travail que le génotype rs3087456 GG était significativement associé à une cinétique défavorable de mHLA-DR avec persistance d'une expression faible au cours du temps, prédisant un phénotype d'immunodépression persistant chez les patients atteints de choc septique.

Les polymorphismes génétiques sont largement reconnus comme des déterminants importants de la réponse de l'hôte aux agents pathogènes et ont été fortement sélectionnés au cours de l'évolution humaine (Quintana-Murci 2019). Ces polymorphismes peuvent donner des déficits immunitaires spécifiques de pathogènes (Casanova and Abel 2007), et/ou seulement être quantifiables après un défi immunitaire, comme les eQTLs (« Expression Quantitative Trait Locus », locus de caractère quantitatif d'expression, le QTL étant un endroit du génome qui est étroitement associé à un caractère quantitatif, et les eQTLs des régions du génome contrôlant le niveau d'ARNm d'un ou de plusieurs gènes) qui dépendent du contexte immunitaire inné (Fairfax *et al.* 2014). Dans ce travail, nous fournissons des données soutenant une variante fonctionnellement importante du promoteur III de *CIITA* sur l'expression de mHLA-DR, chez les patients et dans les expériences *ex vivo*, qui est associée à une mauvaise évolution clinique après un sepsis et qui peut être une cible réaliste pour une immunomodulation personnalisée.

1.2 Effet du polymorphisme G-286A*rs3087456 de *CIITA* sur la régulation de l'expression de mHLA-DR

L'effet du polymorphisme G-286A*rs3087456 sur la régulation de l'expression de mHLA-DR n'a jamais été étudié auparavant. À notre connaissance, il s'agit de la première étude examinant les effets régulateurs de ce polymorphisme du promoteur III de *CIITA*. Nos résultats suggèrent que le génotype GG modifie l'activité de pIII chez les monocytes et les cellules B mais pas chez les cellules T. De manière inattendue, en condition basale (par exemple, sur des monocytes et lymphocytes B de volontaires sains), l'induction des transcrits dérivés de pIII (isoformes de pIII) n'est pas significativement différente entre les haplotypes. Après une stimulation *ex vivo* à l'IFN- γ , l'expression des transcrits de pIII est augmentée uniquement dans les monocytes des génotypes GG et AA ou AG. De même, l'expression des transcrits pIV n'est pas différente dans les conditions basales, mais l'expression augmente après administration d'IFN- γ seulement chez les monocytes. Ces résultats suggèrent que, dans des conditions saines, l'induction transcriptionnelle contrecarre l'activité altérée du promoteur des

haplotypes GG, ou que le répresseur inhibe la transcription pour les haplotypes AA ou AG, ces deux hypothèses englobant des mécanismes complexes de régulation de la transcription.

L'étude présentée n'a pas pu identifier les mécanismes précis par lesquels ces polymorphismes sont associés à une diminution de l'expression de mHLA-DR chez les individus homozygotes pour G-286A*rs3087456. Ceci n'est pas surprenant étant donné l'hétérogénéité de la réponse transcriptionnelle au cours du sepsis et la complexité de la régulation du gène *HLA-DR*. Récemment, des oligodéoxynucléotides (ODN) CpG et non-CpG (« immune-enhancing CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides ») ont été décrits comme jouant un rôle dans la régulation de l'expression du CMH de classe II et des molécules costimulatrices. Wang *et al.* (Wang *et al.* 2007) ont montré que les ODN non-CpG (rODNs) régulent à la baisse l'expression de HLA-DR chez les monocytes et bloquent la transcription de *CIITA* dirigée par le promoteur III dans ces cellules. Les effets moléculaires inhibiteurs précis des rODN sur l'activité du pIII ne sont pas entièrement compris, et plus particulièrement, l'interaction précise avec le promoteur n'a pas été étudiée. Lohsen *et al.* (Lohsen *et al.* 2014) ont décrit un élément régulateur distal, connu sous le nom de site hypersensible 1 - HSS1 (situé ~3kb en amont de pI) avec PU.1, NF-κB, et Sp1 interagissant avec pIII par une interaction en boucle (cf. Figure 16). De manière intéressante, des éléments régulateurs proximaux ont été décrits, et incluent des inducteurs (par exemple : AP-1, Sp1, CREB, NF-γ, ARE-1, ARE-2), et des répresseurs (par exemple : PRDI-BF1/BLIMP-1, ZBTB32). D'autres mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'expression de *CIITA*. Parmi ceux-ci, dans les cellules B, l'accès restreint du promoteur I dû à une méthylation étendue de l'ADN induit un passage vers l'activation de pIII (Lohsen *et al.* 2014).

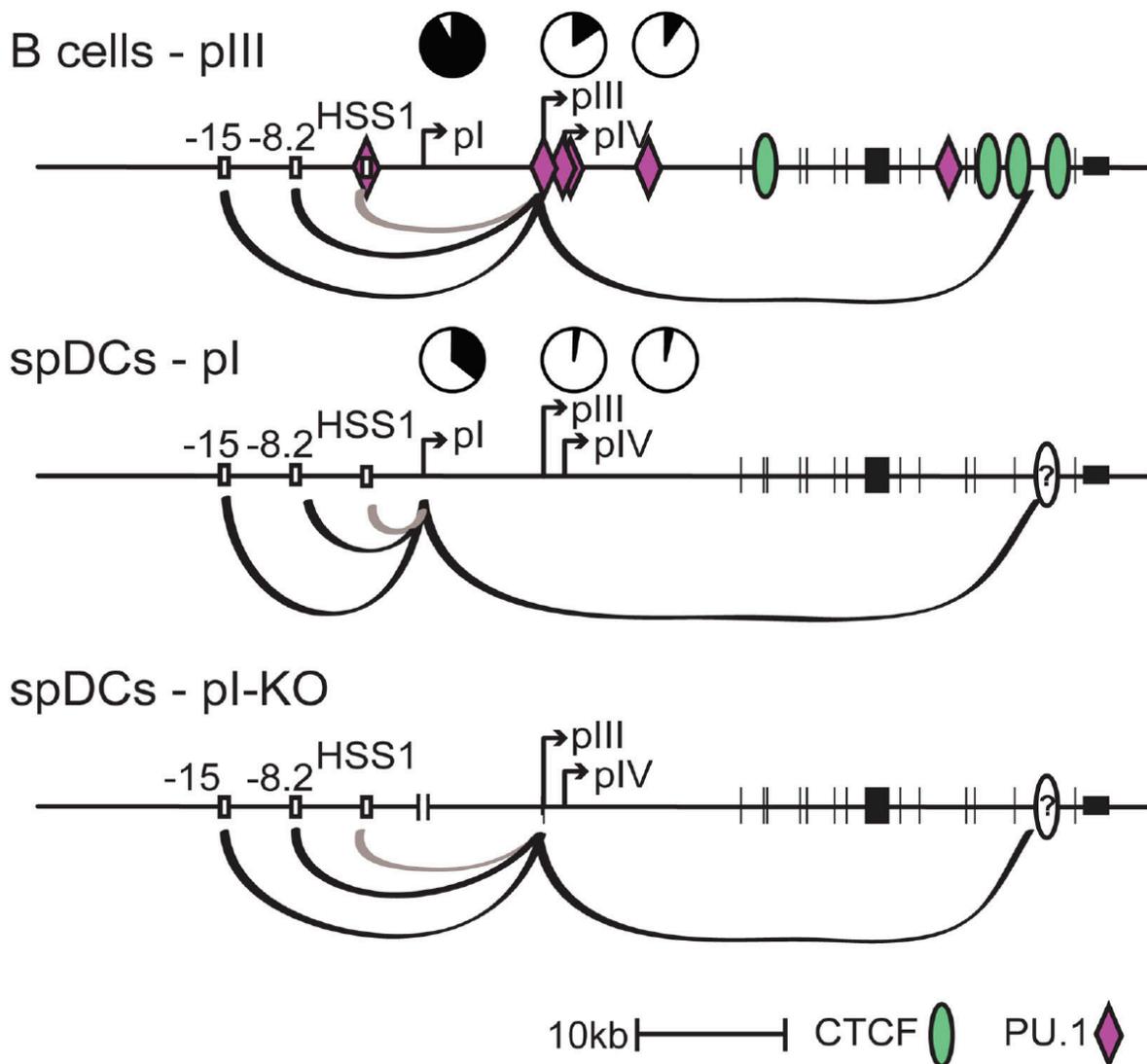


Figure 16 : Schéma de l'architecture 3-D du locus de *CIITA* avec utilisation différentielle des promoteurs, d'après Lohsen et al. (Lohsen et al. 2014)

L'architecture *CIITA* est indiquée pour les cellules B et les spDC. Les lignes sombres indiquent de fortes interactions 3-D, tandis que les lignes grises indiquent des interactions 3-D plus faibles. Les ovals verts et les diamants magenta illustrent les sites CTCF et PU.1, tandis que les boîtes noires et ouvertes représentent les exons et les éléments régulateurs distaux, respectivement. La méthylation globale au niveau de chaque promoteur est affichée, à l'exception de *pI* dans le spDC *pI-KO*, où les CpGs ont été supprimés par la délétion KO.

La région -300 de *CIITA* a été bien identifiée comme une région importante de régulation proximale (Ghosh *et al.* 1999). Il est plausible que le polymorphisme G-286A*rs3087456 puisse interférer avec la transcription chez les monocytes durant le sepsis et que l'expression de *CIITA* soit rétablie par la stimulation à l'IFN- γ . Il est

difficile de savoir si cela peut être directement lié à un mécanisme de régulation cis- ou trans-. Ni *et al.* (Ni *et al.* 2008) ont identifié un amplificateur distal dépendant, régulant l'expression de *CIITA* induite par l'IFN- γ par le biais de pIV (cf. Figure 17). Cette activation du promoteur induite par l'IFN- γ est dépendante de BRG1, un facteur de remodelage ATP-dépendant, qui favorise la formation d'une boucle chromatinienne tridimensionnelle dynamique et démontre l'importance des régions distales d'enhancer/silencer dans la régulation de l'expression de *CIITA* (cf. Figure 18). Dans notre étude, nous avons montré que l'expression chez les monocytes des isoformes issues de pIV est $\sim 2,7$ fois plus élevée après stimulation par IFN- γ , que celle de pIII, ce qui confirme l'activation préférentielle de pIV après l'induction par IFN- γ . Dans l'ensemble, ces faits soutiennent la preuve que l'IFN- γ est un inducteur préférentiel de l'expression de *CIITA*, qui peut pallier l'altération phénotypique des monocytes (et au déficit d'expression des molécules du CMH de classe II) des patients septiques, déclenchée par le polymorphisme G-286A*rs3087456. Le mécanisme transcriptionnel détaillé est inconnu, mais la complexité de la régulation de l'expression de *CIITA* rend difficile la détermination précise en dehors de l'analyse à haut débit des promoteurs.

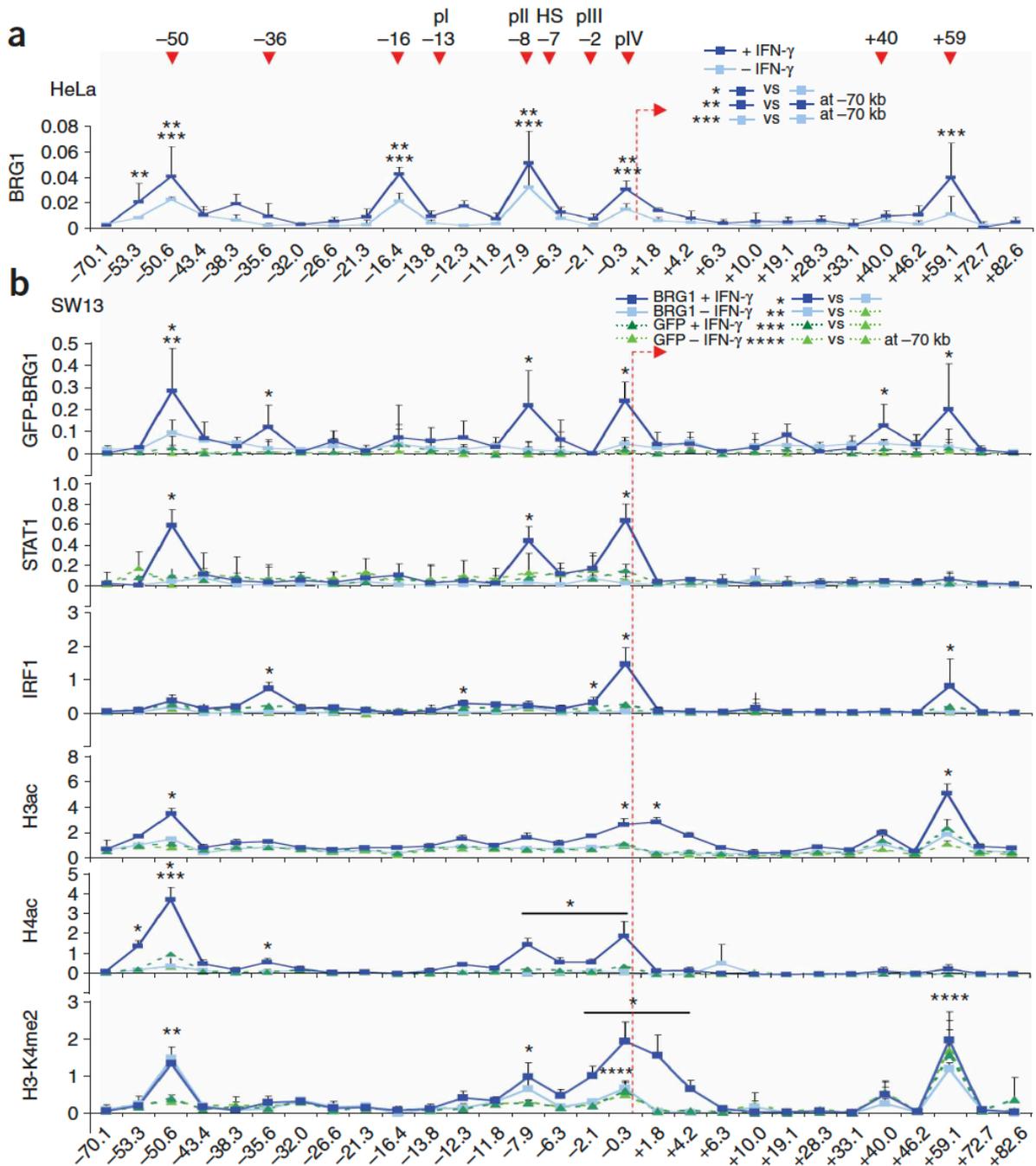


Figure 17 : Événements distaux dépendants de BRG1 à CIITA, d'après Ni et al. (Ni et al. 2008).

(a) ChIP-PCR quantitative de la chromatine de cellules HeLa non traitées ou traitées par IFN- γ , analysée avec anti-BRG1. (b) Analyse par ChIP-PCR quantitative (présentée en % d'entrée) de la chromatine de cellules SW13 transduites avec Ad-GFP-BRG1 ou Ad-GFP, et laissées non traitées ou stimulées avec IFN- γ pendant 6 heures. *, **, *** et ****, valeurs cinq fois supérieures au signal de fond au site de contrôle à -70 kb. ($P < 0,01$ pour les comparaisons en haut à droite). Les flèches en pointillés rouges indiquent le début de la transcription au niveau de pIV ; les pointes de flèche rouges vers le bas en haut indiquent la position (en kb) des éléments éloignés de pIV ; au-dessus, les positions de pl, pII, pIII et un site

hypersensible identifié dans une lignée cellulaire de glioblastome. Les données (moyenne et écart-type) sont représentatives d'au moins trois expériences.

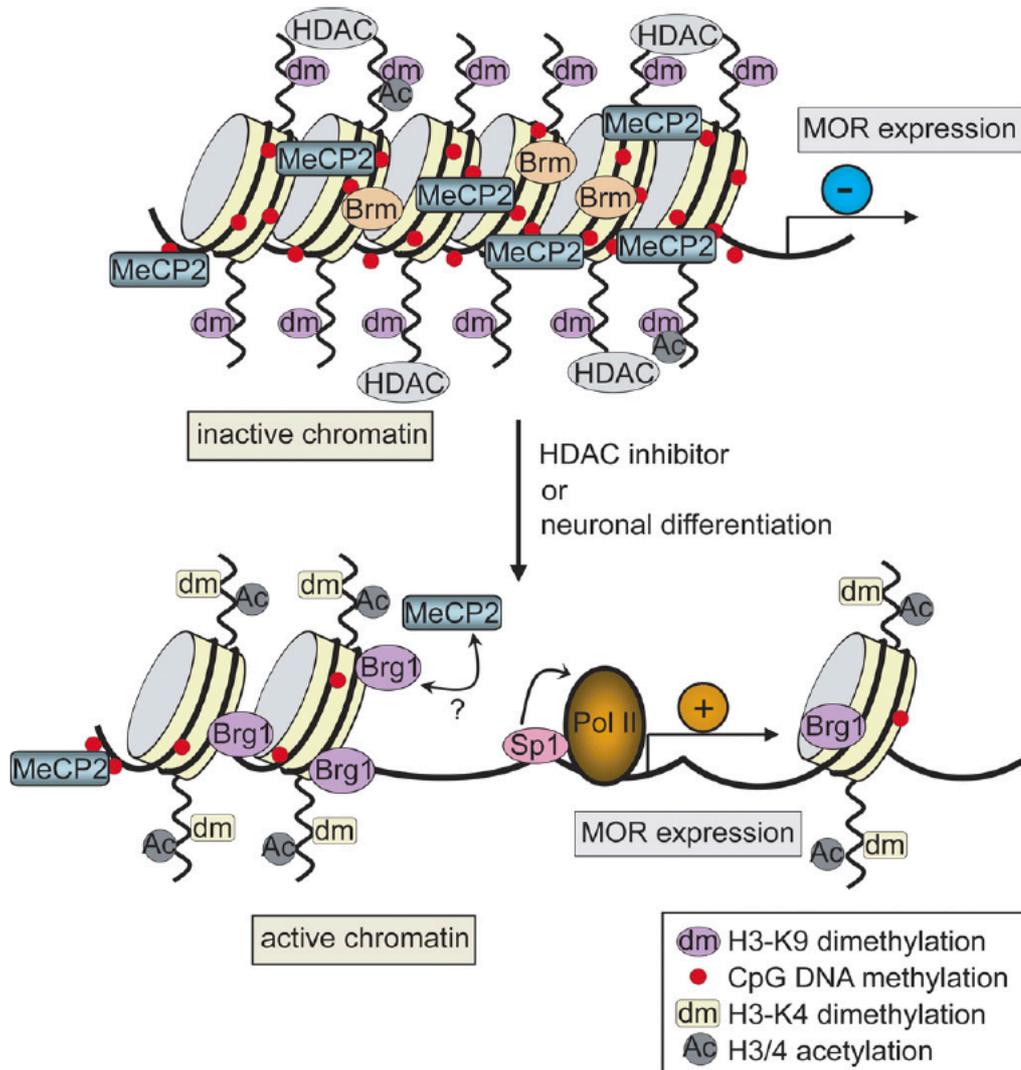


Figure 18 : Exemple d'un mécanisme moléculaire proposé pour la régulation des gènes MOR (« μ opiod receptor ») par le remodelage de la chromatine, d'après Hwang et al. (Hwang et al. 2010).

Il a été démontré que CIITA régule l'expression de plusieurs gènes de l'immunité non liés au CMH de classe II, tels que l'interleukine (IL)-4, le collagène $\alpha 2$, le ligand Fas et la plexine A1 (Ting and Trowsdale 2002). CIITA est capable d'inhiber l'expression de MMP-9, une métalloprotéinase matricielle impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire dans les lésions pulmonaires associées au sepsis (Nozell *et al.* 2004). Cet effet est médié par la liaison et la séquestration

de la protéine de liaison CREB par CIITA, et donc par une réduction de l'activité du promoteur de MMP-9, illustrant la complexité de la signalisation médiée par la CIITA à travers des voies transcriptionnelles et non transcriptionnelles.

Les polymorphismes des promoteurs de *CIITA* sont impliqués dans des maladies auto-immunes, ce qui souligne leur rôle dans l'immunorégulation de manière plus générale (Swanberg *et al.* 2005; Vasseur *et al.* 2012). En effet, le plus grand défi à la compréhension de la régulation des gènes chez les monocytes est probablement l'intégration des effets régulateurs proximaux (cis) et distaux (trans) sur les loci génétiques dans les maladies complexes, plutôt qu'*in vitro* (Fairfax *et al.* 2014).

Cette étude a soulevé un certain nombre de questions. Parmi celles-ci, l'effet spécifique de CIITA G-286A*rs3087456 sur l'expression des transcrits de *CIITA* chez les patients septiques est inconnu. Il est probable que le mécanisme de régulation (par exemple, la réponse à la phase aiguë, les cytokines, les stéroïdes, les médicaments adrénergiques) rencontré pendant le sepsis puisse modifier de manière significative la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de *CIITA*, mais étant donné la rareté de ce SNP et la nécessité d'expériences *ex vivo* en temps réel, une telle étude peut être difficile à réaliser.

2 Altération de la réponse myéloïde à l'infection : exemple du COVID-19 (travail présenté dans les annexes)

Les cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes sont des précurseurs immatures myéloïdes hétérogènes de la moelle osseuse qui peuvent dans certaines conditions pathologiques, telles que le cancer, le sepsis et les maladies auto-immunes, interrompre partiellement leur différenciation et leur extension. Deux types de cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes ont été identifiées, provenant de précurseurs des PMN (« Polymorphonuclear cells ») ou des monocytes. Les MDSC induisent l'apoptose des lymphocytes T et des cellules NK, inhibent la prolifération des cellules T, induisent l'expansion des cellules régulatrices T et produisent des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 (Gabrilovich and Nagaraj 2009; Bronte *et al.* 2016). Il a été démontré qu'une proportion élevée de PMN- et de M-MDSC est associée au développement

d'infections secondaires et à une mortalité précoce (Janols *et al.* 2014; Mathias *et al.* 2017; Uhel *et al.* 2017; Waeckel *et al.* 2020). Waeckel *et al.*, dans une série étudiant les cellules de type M-MDSC-like, après gating secondaire (CD14⁺HLA-DR^{low}CD15⁻CD33⁻) chez des patients septiques, ont identifié une valeur seuil, > 9%, significativement associée à la mortalité à 28 jours et à la survenue d'infections secondaires (Waeckel *et al.* 2020).

La réponse de l'hôte à l'infection est complexe. La dysrégulation de réponse immunitaire innée initialement met en jeu à la fois un déficit quantitatif et qualitatif des réactions physiologiques pro-inflammatoires, mais aussi anti-inflammatoires. C'est le cas des cellules myéloïdes (cf. p. 135, « Les phénotypes myéloïdes dans les cas graves de COVID-19 prédisent l'apparition d'infection secondaire et la mortalité : une étude pilote »). En effet, l'étude pilote que nous avons menée chez les patients adultes COVID-19 gravement malades a identifié deux caractéristiques myéloïdes prototypiques associées à la survenue d'une infection secondaire et à la mortalité. La cinétique de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes et la présence de M-MDSC (« Monocytic Myeloid-derived suppressor cells »), illustrant toutes deux la présentation de l'antigène par les cellules myéloïdes et la fonction suppressive des cellules immunitaires, ont montré des profils spécifiques chez les COVID-19 sévères.

2.1 HLA-DR monocytaire et infection sévère à COVID-19

Contrairement aux séries publiées suggérant une diminution systématique ou un faible taux de mHLA-DR (< 15 000 AB/C) dans le COVID-19 sévère (Benlyamani *et al.* 2020), nous avons identifié trois cinétiques mHLA-DR distinctes, suggérant trois groupes de patients. L'analyse de la cinétique mHLA-DR a permis une caractérisation précise de l'adaptation immunologique en lien avec la gravité de la maladie. Bien que dans le cas du COVID-19, le niveau de mHLA-DR ne semble pas aussi bas que celui observé lors de choc septique (< 8000 AB/C), dans notre étude, les cinétiques de profil observées dans le cluster 2 (PID : « prolonged immunodepression ») et le cluster 3 (TID : « transient immunodepression ») étaient différenciellement associées au développement d'une infection secondaire, ce qui est conforme à l'expérience publiée lors de choc septique (Venet *et al.* 2013b). D'ailleurs, une diminution de mHLA-DR dans les cas de COVID-

19 sévères a été montrée à la fois chez les adultes et les enfants (Carter *et al.* 2020; Moratto *et al.* 2020; Spinetti *et al.* 2020; Wang *et al.* 2020; Nguyen *et al.* 2021).

Spinetti *et al.* ont montré que les patients gravement malades, initialement admis dans les services généraux et transférés secondairement dans les unités de soins intensifs, avaient un mHLA-DR plus élevé que ceux directement admis dans l'unité de soins intensifs (Spinetti *et al.* 2020). De même, Moratto *et al.* ont montré que les patients hospitalisés pour COVID-19 et dont l'état évolue vers une aggravation de la maladie, présentaient un niveau de mHLA-DR inférieur (Moratto *et al.* 2020). Dans une cohorte de 157 patients COVID-19, Wang *et al.* ont montré que les 62 patients qui décédaient avaient un niveau mHLA-DR significativement diminué après 10 jours (Wang *et al.* 2020). Il est intéressant de noter qu'un rapport préliminaire chez les enfants a suggéré que mHLA-DR était fortement diminué chez les enfants atteints du syndrome inflammatoire multisystémique sévère lié au COVID-19, mais n'a pas pu mettre en évidence une association avec la mortalité (Carter *et al.* 2020). Dans notre étude, la cinétique de mHLA-DR entre les personnes décédées et les survivantes n'était pas significativement différente, bien que ce résultat ait pu être entravé par la période de suivi limitée.

2.2 Phénotype myéloïde d'activation macrophagique

Contrairement à l'expérience précédemment publiée, nous avons identifié un troisième groupe de patients, avec un mHLA-DR élevé, et de façon persistante, suggérant un phénotype d'activation monocyttaire prolongée. Cette cinétique de mHLA-DR, bien que moins fréquente, a également été identifiée dans une série (Spinetti *et al.* 2020). Dans notre cohorte, ces patients présentaient une inflammation systémique sévère, une ferritine élevée, un fibrinogène élevé, une lymphopénie et, chez l'un d'entre eux, une activation macrophagique confirmée par une analyse de la moelle osseuse, renforçant un phénotype potentiellement « monocyte/macrophage hyperactivé » (HAMM : « hyperactivated monocytes/Macrophage »). L'utilisation de mHLA-DR pour identifier les patients gravement malades présentant un syndrome d'activation macrophagique a récemment été suggérée et pourrait s'avérer être un critère de dépistage efficace chez les patients présentant un COVID-19 sévère et une suspicion de HAMM mimant un syndrome d'activation des macrophages (Remy *et al.* 2018). Cette

constatation complète des observations antérieures suggérant que la COVID-19 peut être associée au syndrome d'activation macrophagique (Dimopoulos *et al.* 2020; Giamarellos-Bourboulis *et al.* 2020; Prilutskiy *et al.* 2020).

2.3 Description des populations myéloïdes en lien avec l'infection sévère à COVID-19

Bien qu'elle ne soit pas unique, l'altération de la réponse myéloïde est de plus en plus reconnue dans la maladie liée au COVID-19. La disparition relative des monocytes non classiques CD14^{low}CD16^{high} semble être une caractéristique de l'infection par le SARS-CoV-2, non observée dans d'autres infections virales, et peut être associée à la gravité de l'infection (Gatti *et al.* 2020; Silvin *et al.* 2020). Comme constaté dans notre travail, une deuxième caractéristique observée dans les cas graves de COVID-19 est la diminution de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes exprimant fortement CD14, qui pourrait être associée à une modification de la réactivité des monocytes circulants aux agonistes bactériens des TLR (Arunachalam *et al.* 2020). Il existe actuellement des arguments significatifs pour suggérer qu'une myélopoïèse d'urgence se produit dans les cas graves de COVID-19. Silvin *et al.* ont montré que des quantités massives de calprotectine et de précurseurs myéloïdes immatures étaient libérés au cours de l'infection par le SARS-Cov-2, soulevant l'hypothèse d'une expansion probable des cellules suppressives dérivées des myéloïdes (Ost *et al.* 2016; Silvin *et al.* 2020). Nous avons ainsi démontré la présence massive de M-MDSC chez les patients COVID-19 gravement malades et son association avec la mortalité. Quelques données préliminaires suggèrent la présence de cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes dans le COVID-19 sévère, leur rôle et la pathophysiologie (Reyes *et al.* 2020; Sacchi *et al.* 2020; Thompson *et al.* 2020). Bordoni *et al.* ont démontré que les patients atteints de COVID-19 sévère, admis en soins intensifs, présentaient une diminution fréquente des lymphocytes T et des cellules NK « natural killer », ce qui correspondait à une expansion des MDSC et à un niveau élevé de cytokines (Bordoni *et al.* 2020). En complément de nos résultats, Sacchi *et al.* ont montré que le pourcentage de polynucléaires (PMN)-MDSC > 54% était associé à la mortalité dans les cas sévères de COVID-19, annonçant l'importance des MDSC dans les cas sévères de COVID-19 (Sacchi *et al.* 2020). Bien que

l'accumulation de cellules myéloïdes immatures soit un marqueur de gravité reconnu dans le sepsis depuis le début des années 1970, le rôle des MDSC dans la physiopathologie des patients septiques gravement malades a été peu étudié (Ost *et al.* 2016; Schrijver, Théroutde and Roger 2019).

Au total, des données convergentes suggèrent que les MDSC jouent un rôle central dans la physiopathologie du sepsis, mais que leur régulation, notamment en ce qui concerne l'organisation temporelle et spatiale, semble être essentielle dans les COVID-19 sévères (Arunachalam *et al.* 2020; Silvin *et al.* 2020).

En conclusion, nos données suggèrent que la cinétique de mHLA-DR permet d'identifier trois phénotypes myéloïdes chez les patients adultes atteints de COVID-19 grave, potentiellement associés à des parcours infectieux spécifiques : phénotypes monocyte/macrophage hyperactivé, immunodépression transitoire et immunodépression persistante.

3 Thérapie immunomodulatrice par IFN- γ dans l'immunosuppression liée au sepsis (travail présenté dans les annexes)

3.1 Effet des thérapeutiques immunomodulatrices dans la restauration de la réponse immunitaire impliquant mHLA-DR et/ou CIITA

Nous avons aussi montré dans notre travail que l'homozygotie pour G-286A*rs3087456 était associée à une faible expression de mHLA-DR chez les patients atteints de sepsis, et que l'IFN- γ était capable de restaurer l'activité du promoteur III de *CIITA*. Dans l'article fondateur de Döcke *et al.* (Döcke *et al.* 1997), les auteurs ont montré que l'IFN- γ était capable de restaurer les fonctions monocytaires chez 8 patients atteints de sepsis. Plus récemment, dans notre travail sur une cohorte de 20 patients pédiatriques et adultes atteints de sepsis, nous avons montré que l'immunothérapie par IFN- γ était sûre pour améliorer la défense immunitaire de l'hôte, et en particulier augmenter l'expression HLA-DR à la surface des monocytes chez les patients présentant une dérégulation prolongée de mHLA-DR (cf. p. 112 « Thérapie immunomodulatrice par IFN- γ dans l'immunosuppression liée au sepsis »). De plus, elle était associée à un taux de

survie plus élevé (Payen *et al.* 2019; Nguyen *et al.* 2021). Ces résultats peuvent suggérer l'utilisation de l'IFN- γ comme thérapie immunitaire ciblée sur les homozygotes GG pour G-286A*rs3087456 afin de restaurer l'expression de mHLA-DR. Leentjens *et al.* (Leentjens *et al.* 2012) ont suggéré, chez des volontaires sains présentant une immunoparalysie induite par les LPS, que l'effet modulateur de l'IFN- γ était variable, malgré l'augmentation significative de l'expression de mHLA-DR. De manière intéressante, le GM-CSF n'a pas induit une augmentation significative de mHLA-DR dans cette étude (Leentjens *et al.* 2012). Ceci est en accord avec l'étude de Hornell *et al.* (Hornell *et al.* 2003) montrant que le GM-CSF augmente l'expression du transcrite de type I et III de *CIITA*, mais pas celui de type IV.

Au cours des dernières décennies, il a été de plus en plus reconnu qu'une grande partie des patients atteints de sepsis souffrent d'une suppression durable de leur système immunitaire (Hotchkiss, Monneret and Payen 2013a). Cette immunodépression est associée à la réactivation d'infections virales latentes (Kaufmann *et al.* 2018), au développement d'infections secondaires et à une détérioration des résultats cliniques (Lukaszewicz *et al.* 2009; Landelle *et al.* 2010). Plusieurs interventions pharmacologiques peuvent rétablir la réponse immunitaire, mais les essais cliniques de grande envergure font actuellement défaut.

Nous avons étudié dans le travail présenté p. 122 (« Expérience multicentrique de traitement par IFN- γ dans l'immunosuppression induite par le sepsis : une série de cas »), la sécurité et les effets immunologiques de l'IFN- γ chez 17 patients adultes et avons constaté que l'IFN- γ augmentait l'expression d'HLA-DR à la surface des monocytes chez tous les patients, sauf un. Le traitement par IFN- γ n'augmentait pas les concentrations de cytokines circulantes : les concentrations d'IL-6 et d'IL-10 étaient inférieures à leurs valeurs de prétraitement. Nous avons observé une tendance à la diminution de la proportion de cellules NK, sans changement pour les autres sous-populations leucocytaires. De plus, les cultures microbiologiques, qui étaient positives avant le traitement par IFN- γ , étaient devenues négatives chez tous les patients. Aucun effet de sécurité jugé attribuable à l'IFN- γ n'a été observé. Dans l'ensemble, la survie semble plus élevée que prévu dans ce groupe spécifique de patients immunoparalysés, mais il est clair que le

nombre de patients était trop faible pour conclure que la restauration de la réponse immunitaire était liée à un meilleur résultat clinique.

3.2 Données cliniques et de sécurité

L'IFN- γ utilisé, dans la série de cas que nous avons étudié, était un IFN- γ humain de type II ayant l'avantage d'être 100 à 1000 fois plus actif que d'autres interférons (Razaghi, Owens and Heimann 2016). Cette molécule a reçu l'approbation de la FDA (« Food and Drug Administration ») pour une application clinique contre la maladie granulomateuse chronique afin de diminuer la sévérité et le nombre d'infections. Des effets bénéfiques d'un traitement adjuvant utilisant l'IFN- γ pour les infections fongiques chez les patients souffrant de granulomatose chronique (International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group 1991), de VIH (Riddell *et al.* 2001; Bodasing *et al.* 2002; Jarvis *et al.* 2012), de leucémie (Poynton, Barnes and Rees 1998; Dignani *et al.* 2005), et chez les patients ayant subi une transplantation d'organe (Armstrong-James *et al.* 2010) ont été précédemment rapportés. Le premier rapport utilisant cet IFN- γ dans le sepsis bactérien humain a été fait par Döcke *et al.* (Döcke *et al.* 1997) chez 9 patients septiques en soins intensifs à la dose de 100mcg par jour. Depuis lors, plusieurs petites séries de cas souffrant d'infections opportunistes (Nakos *et al.* 2002; Delsing *et al.* 2014), de cas pédiatriques (Tissières *et al.* 2012; Leentjens *et al.* 2017) ou de cas de VIH (Riddell *et al.* 2001; Bodasing *et al.* 2002; Jarvis *et al.* 2012) ont été publiées. La série de cas que nous présentons est la première à rapporter l'utilisation de l'IFN- γ dans le cadre d'un sepsis bactérien chez l'adulte et l'enfant, y compris chez des patients en choc septique, avec des modifications du taux de cytokines et un immunophénotypage. Le délai d'utilisation de l'IFN- γ à partir de l'hospitalisation en réanimation différait largement au sein des 2 petites cohortes rapportées. On pourrait dire que l'issue défavorable chez 2 patients de la 2^{ème} cohorte, traités précocement, pourrait suggérer que le traitement par IFN- γ ne devrait pas être utilisé trop tôt, même lorsque l'expression de HLA-DR est déjà supprimée.

Dans le groupe traité précocement, les patients sont encore dans la partie abrupte de la courbe de survie avec une mortalité élevée (près de 50%) (Sweeney and Wong 2016). Néanmoins, les cas de la 2^{ème} cohorte traités précocement (< 4 jours

après l'admission pour choc septique) présentaient une régulation rapide de l'expression de mHLA-DR, répondant bien à la stimulation par l'IFN- γ . L'absence de signal positif sur l'évolution clinique pourrait être liée à une régulation négative adaptée à la phase aiguë, sans avantage à administrer l'IFN- γ .

Le bénéfice clinique du traitement par IFN- γ est apparu favorable dans la 1^{ère} cohorte avec seulement 1 décès. L'état de tous les patients de la cohorte, sauf un, s'est suffisamment amélioré pour qu'ils puissent sortir des soins intensifs. Cette observation suggère que l'IFN- γ est plus efficace cliniquement si la réponse immunitaire supprimée est présente pendant une période plus longue et est associée à de nouvelles infections. Nous avons émis l'hypothèse que la durée, plus que la profondeur, de la régulation négative de mHLA-DR est pertinente pour le clinicien afin de détecter le risque de nouvelles infections. Cet aspect devrait être vérifié dans une plus grande population. Comme indiqué précédemment, le traitement par IFN- γ a été bien toléré par nos 20 patients, sans effets secondaires sévères clairement attribuables. La surveillance de l'expression de HLA-DR sur les monocytes circulants semble adéquate pour suivre l'efficacité immunologique du composé, un examen de surveillance immunitaire relativement bon marché.

Cette série de cas présente des limites importantes, principalement liées à sa nature observationnelle et à l'utilisation compassionnelle du médicament. Les 20 cas collectés sont trop peu nombreux pour tirer des conclusions définitives sur le bénéfice clinique de ce traitement. Cependant, en regroupant les rapports de cas et les autres séries de cas, on obtient au moins 50 cas traités par IFN- γ . Globalement, une excellente tolérance a été rapportée en utilisant une dose de 100 mcg par jour chez l'adulte. Il est encore essentiel de déterminer la relation dose-réponse et la tolérance d'un éventuel traitement répétitif pour compléter le profil de sécurité du composé. Malgré le petit nombre de cas, il est intéressant de noter que mHLA-DR a augmenté de manière significative après la première injection, et a diminué rapidement après l'arrêt du traitement.

3.3 Données immunologiques

Les concentrations des cytokines circulantes ont été mesurées dans la première cohorte afin d'examiner si l'immuno-stimulation par l'IFN- γ entraînait ou non une

augmentation de ces cytokines, ce qui pourrait avoir des effets délétères. Cela n'a pas été le cas, les niveaux d'IL-6 et d'IL-10 circulant diminuaient après traitement par IFN- γ . Par ailleurs, chez les volontaires exposés deux fois à l'endotoxine, le traitement par IFN- γ avait rétabli la réponse cytokinique supprimée lors de la seconde exposition à l'endotoxine. Ainsi, l'IFN- γ prévient et inverse la tolérance à l'endotoxine induite *in vivo*, sans signe de réponse excessive (Leentjens *et al.* 2012). Des changements modestes induits par l'IFN- γ dans les sous-populations de lymphocytes étaient observés, sauf pour le nombre absolu de cellules NK. La tendance claire à la diminution des cellules NK dans notre série de cas peut résulter d'une migration dans les tissus infectés ou d'une réduction de la génération de cellules NK. Comme elle a été peu rapportée, cette observation faite dans une cohorte de petite taille doit être interprétée avec prudence. La série de cas rapportés sur l'infection fongique invasive n'a pas montré de changements dans le nombre total de leucocytes et de granulocytes lorsque le traitement par IFN- γ était administré (Delsing *et al.* 2014).

On peut aussi noter une limite de ce travail quant à la compréhension immunologique : la polarisation des macrophages ou des monocytes (M1 ou M2) n'a pas été testée dans nos cas, ce qui a entravé la compréhension des mécanismes de reprogrammation et son impact sur la polarisation macrophage-monocyte.

Au total, le sepsis induit une suppression du système immunitaire, associée à une susceptibilité aux infections secondaires et à une altération du résultat clinique. Nous rapportons des cas pour lesquels le traitement par IFN- γ a été bien toléré et a amélioré la défense immunitaire de l'hôte. L'augmentation de l'expression HLA-DR à la surface des monocytes n'a pas induit une tempête de libération de cytokines ni une modification dans l'immunophénotypage des lymphocytes, à l'exception d'une diminution du nombre absolu de cellules NK. Dans les limites de la petite taille de la cohorte, le bénéfice clinique de l'IFN- γ pour stimuler l'immunité innée en présence d'une immunosuppression est une piste intéressante pour l'avenir.

4 Perspectives

La compréhension des mécanismes immunologiques de l'immunosuppression liée au sepsis est un défi majeur quant aux possibilités thérapeutiques d'immunomodulation. L'identification des facteurs favorisants, notamment génétiques, pourrait permettre de cibler les patients pouvant potentiellement bénéficier de ces thérapeutiques, comme par exemple, la recherche des polymorphismes génétiques de CIITA chez les patients en état de choc septique. De plus, l'avenir du développement de ces thérapeutiques est intriqué à un suivi et une évaluation par monitoring, au mieux, au lit du patient, afin d'initier (diagnostic, durée et profondeur de l'immunosuppression), de suivre (cinétique de l'évolution) et d'arrêter le traitement (récupération ad integrum des fonctions immunologiques). L'expression monocytaire d'HLA-DR est actuellement le marqueur le plus solide dans l'évaluation de l'état d'immunosuppression.

La poursuite de notre travail se fera par la finalisation des expériences et l'analyse des données du travail de caractérisation du profil fonctionnel immuno-inflammatoire après une transplantation hépatique chez l'enfant afin de définir son association avec la survenue de complications infectieuses et immunologiques. Ce travail prospectif apportera nous l'espérons un niveau supplémentaire de compréhension en permettant mettre en évidence des biomarqueurs identifiés pour fournir de nouveaux outils diagnostiques et pronostiques pour cibler les enfants à risque de développer des complications infectieuses post-opératoires. De plus, les phénotypes cliniques, immunologiques et les caractérisations fonctionnelles apporteront un nouvel éclairage sur la compréhension de la récupération immunitaire après une transplantation hépatique. Enfin, peu de données sont disponibles sur les profils transcriptomiques des enfants atteints d'immunoparalysie. Notre travail de recherche consistera aussi l'analyse des profils d'expression de l'ARN pour tenter de mettre en évidence des différences entre les groupes d'enfant à complications infectieuses ou non. Elle pourra identifier des profils de voies régulées à la baisse ou à la hausse chez les enfants atteints d'immunoparalysie et suggérer des données d'expression génique potentiellement utiles pour identifier les enfants atteints d'immunoparalysie (Snyder *et al.* 2021).

A propos de *CIITA*, d'autres travaux prévus vont concerner le rôle des polymorphismes génétiques décrits dans la régulation post transcriptionnelle de l'expression de mHLA-DR. L'un des thèmes de recherche s'intéressera aux conséquences des SNPs sur la question de la séquestration intracytoplasmique de mHLA-DR (cf. Figure 19) (Fumeaux and Pugin 2002).

Afin de mieux approcher les conditions *in vivo* et d'affiner les effets des SNPs sur la réponse au sepsis et à l'IFN- γ , nous avons débuté la mise en œuvre d'un test de tolérisation sur sang total de volontaires sains, génotypés sur les SNPs de *CIITA*, avec ajout de LPS à 6h d'intervalle, puis +/- induction par IFN- γ . L'idée de ce travail est d'évaluer *ex vivo* l'effet de la stimulation par IFN- γ sur les monocytes sains circulant mis de façon expérimentale en état d'immunosuppression (ou plutôt de tolérisation), en fonction du génotype, et via la mesure de l'expression de mHLA-DR.

En termes d'étude du promoteur de *CIITA*, des travaux seront réalisés sur les interactions des promoteurs III et IV, au vu de nos résultats observant que les SNPs situés sur pIII régulent le niveau d'activité du promoteur et d'expression des isoformes de pIV. De nombreuses hypothèses peuvent être soulevées et l'étude par immunoprécipitation de la chromatine, ou CHIP, pourra peut-être permettre d'en préciser certaines. Cette technique à base d'anticorps est utilisée pour enrichir sélectivement des protéines spécifiques de liaison à l'ADN avec leurs cibles d'ADN. La CHIP est utilisée pour étudier une interaction protéine-ADN particulière, plusieurs interactions protéine-ADN, ou des interactions sur l'ensemble du génome ou un sous-ensemble de gènes. Elle pourrait permettre d'identifier une influence des SNPs de pIII dans le « remodeling » (boucles) de la chromatine, et plus largement dans la conformation de l'ADN. Elle pourrait aussi permettre de décrire des modifications d'accessibilité des facteurs de transcriptions à pIV.

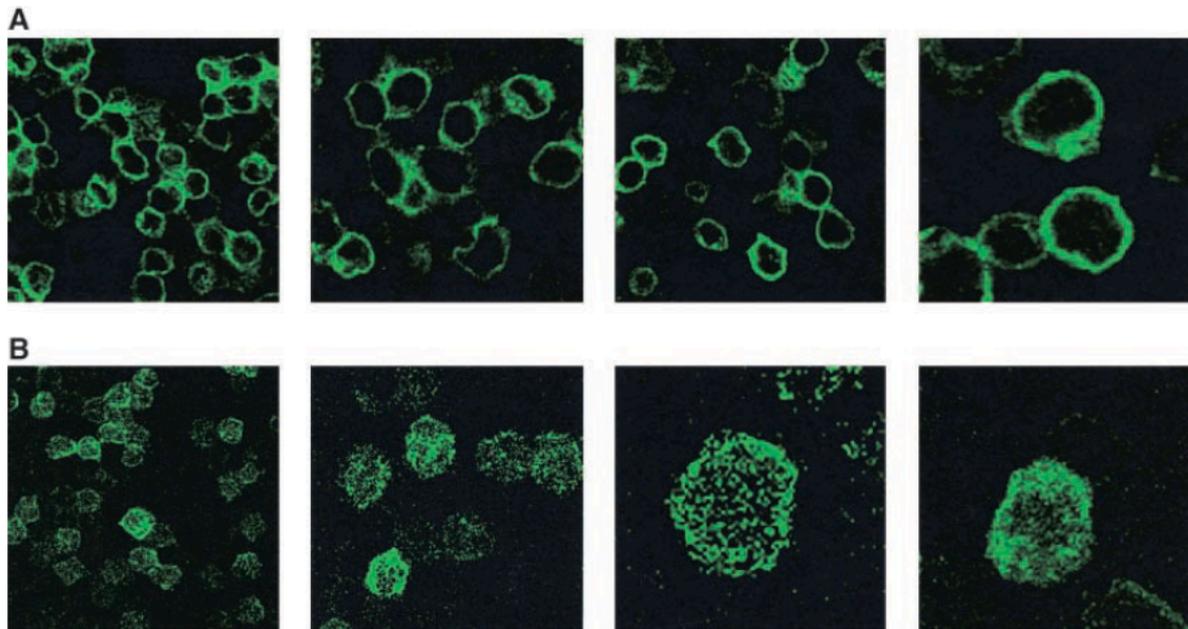


Figure 19 : Localisation d'HLA-DR chez les monocytes perméabilisés par microscopie confocale à immunofluorescence, d'après Fumeaux et al. (Fumeaux and Pugin 2002).

(A) Images représentatives de monocytes provenant de deux volontaires sains. (B) Images représentatives de monocytes provenant de quatre patients présentant un choc septique.

CONCLUSION

Le travail principal de cette thèse est centré sur la description de l'effet de polymorphismes génétiques situé sur *CIITA*, gène codant pour protéine intracellulaire indispensable à l'expression du CMH de classe II, et donc à la réponse immunitaire innée lors de l'infection. En partant de données de sélections positives dans la région 5' du gène, en population humaine, ainsi que de corrélations entre l'apparition de maladies inflammatoires et ces mêmes polymorphismes situés dans le promoteur III du *CIITA*, nous avons confirmé l'hypothèse qu'un des SNP (G-286A*rs3087456) était impliqué dans l'évolution défavorable des patients en choc septique. Cette évolution vers le décès était liée à l'impossibilité de restaurer une réponse immunitaire correcte avec persistance d'un état d'immunosuppression lié au sepsis, confirmé par l'absence l'augmentation de l'expression d'HLA-DR à la surface des monocytes. Au niveau cellulaire, nous avons mis en évidence que ce SNP diminuait l'activité du promoteur III dans les lignées cellulaires monocytaires. Nous avons aussi constaté que l'adjonction d'une immuno-stimulation par IFN- γ permettait de récupérer une activité normale du promoteur III. De plus, dans une série de patients en choc septique, nous avons décrit une amélioration de l'immunosuppression via le monitoring de l'expression de mHLA-DR, après traitement par IFN- γ , associé à une amélioration clinique. Ce traitement immunomodulateur serait donc potentiellement efficace chez les patients ciblés en état d'immunosuppression après un choc septique.

L'amélioration du monitoring de l'immunosuppression avec des techniques cytométriques rapides en « no lyse, no wash » sur des petits volumes de sang et disponibles au lit du malade, ainsi que la compréhension exhaustive des mécanismes de la réponse immunitaire à l'infection, comme le rôle immunosuppresseur des cellules myéloïdes, sont des pistes à développer afin d'optimiser la prise en charge des patients.

D'autres travaux seront nécessaires à la compréhension globale des mécanismes de régulation de l'expression d'HLA-DR et de *CIITA*. La séquestration intracytoplasmique des protéines du CMH et l'analyse en CHIP des régions promotrices du gène de *CIITA* permettraient d'explorer ces domaines encore mal connus.

ANNEXES

1 Expérience multicentrique de traitement par IFN- γ dans l'immunosuppression induite par le sepsis : une série de cas

1.1 Contexte

L'immunodépression induite par le sepsis contribue à aggraver le pronostic clinique de divers états de stress. Ce syndrome, bien documenté, se caractérise entre autres par une atténuation des fonctions des cellules immunitaires innées et adaptatives. Plusieurs interventions pharmacologiques visant à restaurer la réponse immunitaire ont fait leur apparition, comme l'IFN- γ . Le but de ce travail a été d'obtenir des informations cliniques sur le meilleur moment d'administration du traitement par IFN- γ au cours de la maladie, ainsi que de valider la tolérance, l'efficacité et les résultats cliniques, avant de réaliser une étude randomisée et contrôlée. Nous avons décrit les effets de l'IFN- γ dans une cohorte de 18 adultes et 2 enfants atteints de sepsis.

1.2 Description de l'étude

Dans cette série de cas, prospective et multicentrique, le traitement par IFN- γ a été initié chez des patients sélectionnés sur des critères cliniques et immunologiques, précocement (< 4 jours) ou plus tardivement (> 7 jours) après le début du sepsis. Les données recueillies chez 18 adultes et 2 patients pédiatriques transplantés hépatiques étaient les suivantes : scores cliniques, expression monocyttaire de HLA-DR (en cytométrie en flux), phénotypage immunitaire des lymphocytes (en cytométrie en flux), taux plasmatiques d'IL-6 et d'IL-10 (par ELISA), cultures bactériennes, gravité de la maladie et mortalité.

1.3 Résultats et conclusion

Chez 15 des 18 patients, le traitement par IFN- γ a été associé à une augmentation de l'expression de la médiane de mHLA-DR, tandis que le nombre absolu de sous-populations lymphocytaires n'a pas été affecté, à l'exception de la diminution du nombre de cellules NK. Les taux plasmatiques d'IL-6 et d'IL-10 étaient diminués de manière significative. Trois patients ayant reçu l'IFN- γ tôt après leur admission en soins intensifs (< 4 jours) sont décédés. Les autres patients ont connu une amélioration clinique rapide évaluée par le score de gravité SOFA et les cultures bactériennes qui étaient positives à plusieurs reprises sont devenues négatives. Les 2 cas pédiatriques se sont améliorés rapidement, mais l'un d'entre eux est décédé d'une complication hémorragique.

Guidée par la surveillance clinique et immunologique, l'immunothérapie adjuvante par IFN- γ semble bien tolérée dans nos cas et améliore la défense immunitaire de l'hôte dans l'immunosuppression induite par le sepsis. Des études cliniques randomisées pour évaluer son bénéfice clinique potentiel sont justifiées.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Multicentric experience with interferon gamma therapy in sepsis induced immunosuppression. A case series



Didier Payen^{1,2*}, Valerie Faivre^{1,2}, Jordi Miatello^{3,4}, Jenneke Leentjens⁵, Caren Brumpt⁶, Pierre Tissières^{3,4}, Claire Dupuis¹, Peter Pickkers^{7†} and Anne Claire Lukaszewicz^{1,2†}

Abstract

Background: The sepsis-induced immunodepression contributes to impaired clinical outcomes of various stress conditions. This syndrome is well documented and characterized by attenuated function of innate and adaptive immune cells. Several pharmacological interventions aimed to restore the immune response are emerging of which interferon-gamma (IFN γ) is one. It is of paramount relevance to obtain clinical information on optimal timing of the IFN γ -treatment, –tolerance, –effectiveness and outcome before performing a RCT. We describe the effects of IFN γ in a cohort of 18 adult and 2 pediatric sepsis patients.

Methods: In this open-label prospective multi-center case-series, IFN γ treatment was initiated in patients selected on clinical and immunological criteria early (< 4 days) or late (> 7 days) following the onset of sepsis. The data collected in 18 adults and 2 liver transplanted pediatric patients were: clinical scores, monocyte expression of HLA-DR (flow cytometry), lymphocyte immune-phenotyping (flow cytometry), IL-6 and IL-10 plasma levels (ELISA), bacterial cultures, disease severity, and mortality.

Results: In 15 out of 18 patients IFN γ treatment was associated with an increase of median HLA-DR expression from 2666 [IQ 1547; 4991] to 12,451 [IQ 4166; 19,707], while the absolute number of lymphocyte subpopulations were not affected, except for the decrease number of NK cells 94.5 [23; 136] to 32.5 [13; 90.8] (0.0625)]. Plasma levels of IL-6 464 [201–770] to 108 (89–140) ng/mL ($p = 0.04$) and IL-10 from 29 [12–59] to 9 [1–15] pg/mL decreased significantly. Three patients who received IFN γ early after ICU admission (<4 days) died. The other patients had a rapid clinical improvement assessed by the SOFA score and bacterial cultures that were repeatedly positive became negative. The 2 pediatric cases improved rapidly, but 1 died for hemorrhagic complication.

Conclusion: Guided by clinical and immunological monitoring, adjunctive immunotherapy with IFN γ appears well-tolerated in our cases and improves immune host defense in sepsis induced immuno suppression. Randomized clinical studies to assess its potential clinical benefit are warranted.

Keywords: Interferon gamma, Immuno-depression, MHC class II, Cytokines, Lymphocyte immuno-phenotyping, Sepsis

* Correspondence: dpayen1234@orange.fr

Peter Pickkers and Anne Claire Lukaszewicz are equally senior Authors.

¹Groupe Hospitalier Saint-Louis Lariboisière, AP-HP, Université Paris 7 Denis Diderot, 2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France

²UMR INSERM 1160 University Paris 7 Denis Diderot, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

One of the major advances in the field of sepsis during the last decade is the accumulation of evidence demonstrating the early shift in immune phenotype from an activated to a suppressed phenotype soon after the onset of sepsis [1]. Although the molecular mechanisms are not fully elucidated yet, the reported immune dysfunction of the cells from septic patients during immunodepression concern both the innate and adaptive immunity [2]. This phenotype is also observed in many other acute injuries suggesting a common pathophysiology after significant stress conditions as trauma [3], cardiopulmonary resuscitation [4], and major surgery [5]. However, if immunodepression is profound and persistent the patients become at risk of secondary infections [6] or are unable to resolve the primary infection [7].

To assess the patients' immune status, immune monitoring becomes essential. Until now, there are few adequate "immunoscope" candidates that are feasible in daily clinical practice and may facilitate the decision-making process. The quantification of the expression of the MHC class II molecule HLA-DR on circulating monocytes appears to represent a suitable parameter [8–11]. A persistent low level of HLA-DR expression is associated with the development of secondary infections and impaired clinical outcome [6, 12]. Of importance, it is becoming increasingly clear that the attenuated immune response can be reversed by different pharmacological interventions, including GM-CSF [13], IL-7 [14], anti-PD [15] and IFN γ [16]. Nowadays, as a last resort treatment, immunostimulating treatment is sometimes applied in critically ill sepsis patients and several small case series have been published [16]. Although effects on clinically relevant end-points can only be determined in randomized clinical trials, relevant data related to immunological properties, safety, and timing of treatment are needed to facilitate the design of such trials.

As previously reported [9], we choose the recombinant human IFN γ to treat immunodepression in different cases phenotype from 3 tertiary hospitals, including children in a context of liver transplantation. This molecule was selected for several reasons: 1- it is already therapeutically used for immune deficiency [17]; 2- the previous case reports did not mention severe side effects; and 3- the impact on innate immunity could be well monitored by the monocyte expression of HLA-DR. [10]

Methods

Patients and methods

Two different cohorts of septic patients (sepsis 2 definition) were collected. The *Cohort 1* of 13 adult patients having a sepsis-induced immunodepression syndrome was collected from May 2004 till 2017 in the Surgical

Intensive Care (SICU) at Lariboisière University Hospital, Paris, France from the large project "Severe Sepsis and inflammation monitoring" approved by Cochin Hospital Ethics Committee (# CCPPRB 2061), Assistance Publique Hôpitaux de Paris. The decision to administer IFN γ was made on the following criteria, which were not modified between 2004 and 2017: (1) an ICU stay over 7 days; (2) a diagnosis of secondary infection/colonization or an uncontrolled initial infection despite adequate antimicrobial therapy and/or interventional procedures; (3) a stable (at least 2 measurements) low level of mHLA-DR expression (<8000 antibody bound/cell (AB/C in our laboratory). Before IFN γ treatment (100mcg per subcutaneous injection, repeated at least 3 days with a maximum duration of 5 days) a written informed consent was obtained for each individual or from closest relative. The clear explanation of the potential risks and benefits to administer the drug as a compassionate treatment was applied according to the French Ethical law. For some patients, pro- and anti-inflammatory plasma cytokines levels were measured before and just after the end of IFN γ treatment. For the first time, the impact on lymphocyte immune phenotype was also evaluated.

The second *Cohort 2* had 4 patients from the Radboud University Medical Centre (Nijmegen, Netherlands). The patients were hospitalized for septic shock (Sepsis 2 definition) and were enrolled in a randomized clinical pilot trial (NCT 01649921). When norepinephrine infusion rate was reduced to 50% of maximum dose, ensuring that the sepsis-induced inflammation was declining (day 0), the administration of IFN γ (100mcg subcutaneous/day) was started. As a consequence, patients in this cohort could be treated with IFN γ earlier the day 7 in the ICU. This pilot trial was prematurely terminated due to a low enrollment rate.

In addition, 2 pediatric cases from the Pediatric Intensive Care (Kremlin-Bicêtre University Hospital) were added. Case 1: a 7 y/o transplanted the 1st time at the first year for fulminant hepatitis had to be transplanted again for chronic humoral rejection despite full treatment. She was referred for end-stage liver failure motivating an emergency liver transplantation 1 month after admission outlined by a hemorrhagic shock. After transplantation, continuous veno-venous hemodiafiltration was used for anuric renal failure and massive fluid overload. Under post-operative immunosuppression (basiliximab on day 1 and 4, methylprednisolone, tacrolimus and mycophenolate mofetil) an invasive aspergillosis (*Aspergillus fumigatus*) was confirmed in BAL, lumbar puncture and blood PCR with serial galactomannan antigenemia and blood PCR. Antifungal therapy associating voriconazole and caspofungine were initiated and immunosuppression stopped. The child developed

an acute and reversible hemorrhagic event related to multifocal intracerebral Aspergillosis lesions, and severe ARDS. In regard to the severity of the infection, rescue IFN γ was considered and proposed as a compassionate treatment. After parent's agreement and despite the modest reduction in mHLA-DR expression (mHLA-DR: 15,000 AB/C), one dose of 100 micrograms of IFN γ was subcutaneously injected. Although the improvement of the child condition (resolution of the respiratory failure and clinical awakening allowing to extubate), the child died on day 18 after transplantation with uncontrolled hemorrhage. Case 2: a 22-month-old boy originally transplanted for biliary atresia, was admitted to be transplanted again for recurrent cholangitis secondary to post-transplantation hepatic artery thrombosis and ischemic cholangitis. The postoperative complications were: a renal tubulopathy; a delayed awakening and a suspicion of ventilatory associated pneumonia. He was rapidly re-intubated because of developed ARDS, associated with anuria, and septic shock with severe hypoxemia despite the use of all techniques to improve oxygenation. Distal lung protected sampling ($> 10^7$ cfu/ml) and ascites were positive for highly resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Maximal supportive therapy associated with iv and aerosolized colistin with potential acquisition of resistance motivated discussion about IFN γ treatment. Monocytic HLA-DR measures were repetitively low (Day 11: mHLA-DR 2773 AB/C) (Fig. 2), 20 micrograms of IFN γ were injected subcutaneously during three consecutive days, with no significant side effect. The child dramatically improved hemodynamically at day 1 after the first IFN γ injection and was extubated 2 days later. Repetitive blood cultures and lung and abdominal samples remained negative. The child remains well thereafter. Both patients' immune monitoring of HLA-DR was monitored by the center A with the same protocol than cohort 1, using the same set up of flowcytometer.

IFN γ treatment

According to previous publication in human sepsis, a dose of 100mcg of IFN γ (Imukin[®], Boehringer, Ingelheim, Germany) was subcutaneously injected for 3 to 5 days (cohort 1) or on days 2–4–7–9–11 (cohort 2) as reported [6, 9, 18, 19]. The treatment was repeated to reach an increased mHLA-DR expression above 8000 AB/C (cohort 1) or MFI > 20 in cohort 2 (low threshold fixed at MFI 20). Clinical tolerance and systemic or local (injection site) symptoms of inflammation were carefully checked.

Immune monitoring

The mHLA-DR expression was measured by flow cytometry (FACSCalibur and FACSCanto, Becton Dickinson, San Diego CA) as previously described in detail [6]. For the

Lariboisière center (cohort 1), the median and IQ range of mHLA-DR expression in healthy people ($n = 50$) was 16, 884 [13,255–20,890] antibody bound per cell (AB/C). In cohort 2, mHLA-DR expression was assessed by the Mean Fluorescence Index (MFI, flow cytometry).

Plasma levels of IL-6 and IL-10 (ELISA method) were measured before, during and the day after the IFN γ treatment cessation in 6 patients of the cohort 1. The impact of IFN γ on lymphocyte subpopulations (CD3, CD4, CD8, CD19, and NK) was also investigated in 6 patients using classic immune-phenotyping method (see Additional files 1 and 2). The results were expressed in absolute values of subpopulations (central laboratory immune-phenotyping).

Because of the relatively small sample size, normal distribution could not be assumed and data is reported as median and interquartile range [IQR]. The non-parametric tests (Mann Whitney and Wilcoxon tests) were used appropriately to check the significant changes over time. Statistical SAS software, version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) was used.

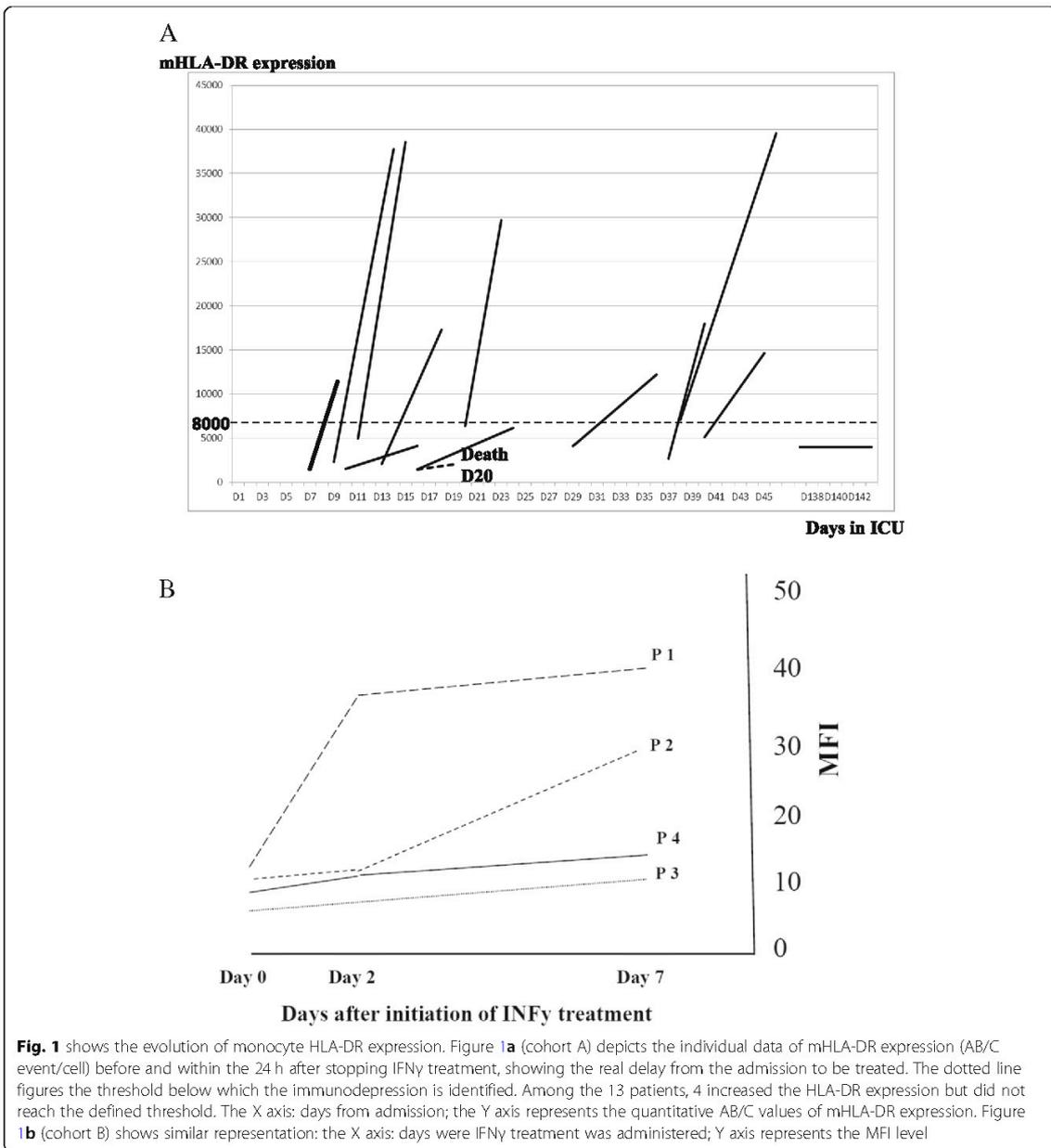
Results

Table 1 shows the characteristics of the cohort 1 and 2 of adult patients. In cohort 1, beside a slight increase in baseline body temperature (pre-treatment value 37.8 °C (37.5–38.4), the temperature increased to 39 °C (38.1–39.7), $p < 0.05$) during IFN γ treatment, no other side effects were observed. Figure 1a shows the individual mHLA-DR expression of the cohort 1 before and the day after stopping IFN γ stimulation with the delay from the ICU admission day. No relation between the time delay or the baseline level of mHLA-DR expression was observed for the drug response. All except one patient with a previously diagnosed Waldenström disease, increased their mHLA-DR expression. This non-responder patient to IFN γ died 3 days after the treatment initiation. Nine out of 13 survivors increased their mHLA-DR above the threshold of 8000 AB/C. In the remaining 4 patients, the HLA-DR expression increased, but not sufficiently to overpass the lower threshold limit and the treatment was stopped. Nevertheless, microbial cultures that remained positive prior to IFN γ treatment became negative in all patients. The bacterial cultures performed 6 days after the onset of IFN γ treatment (*i.e* 1 to 4 days after treatment) were all negative. The daily collected SOFA scores before during and after IFN γ administration decreased in 10 of 13 patients (Additional file 3: Figure S1). Only one patient having responded adequately to IFN γ treatment developed 6 days later a new pulmonary infection with positive cultures (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* and *Aspergillus fumigatus*) and recurrent immunodepression. This new infection episode occurred despite maintenance of adequate antimicrobial treatment concomitantly with a drop

Table 1 Clinical and infection characteristics of patients treated with IFN γ for cohort 1 and Cohort 2. AB/C = antibodies per cell. MFI = Mean Fluorescence Intensity

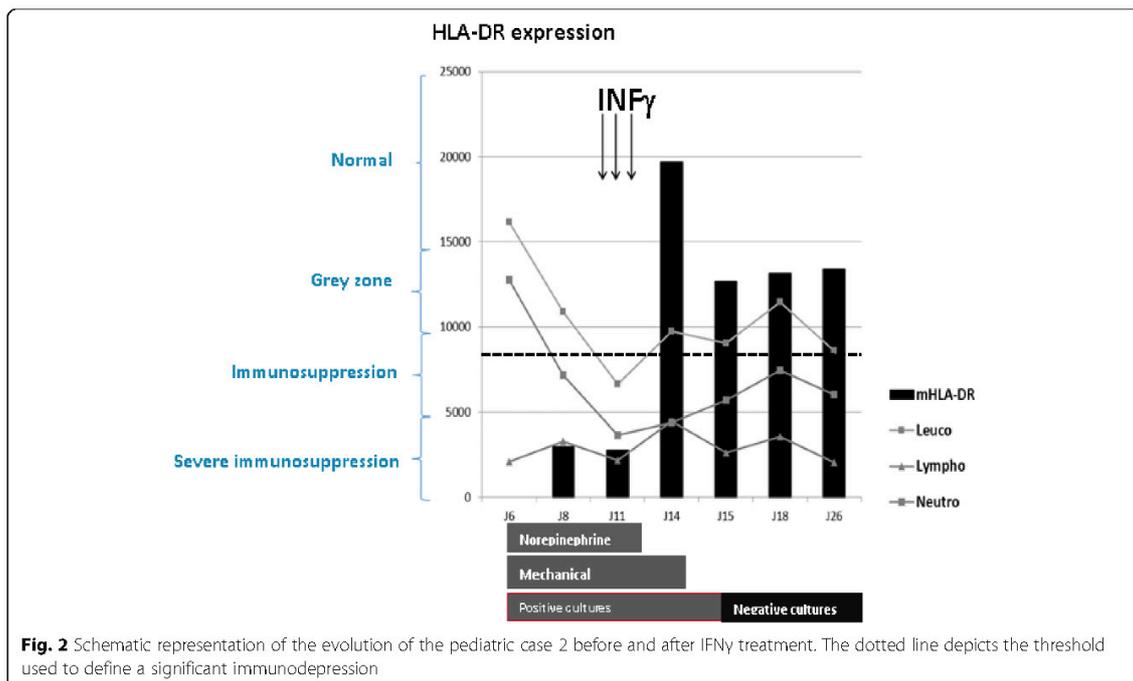
Cohort 1									
	Age	Diagnosis at admission	Day of ICU	Secondary infection	microorganism	Antibiotic treatment	mHLA-DR (AB/C)	Injections of IFN γ	Day-15 outcome
1	30	Cardiac arrest	10	VAP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	amikacin (4 days) + colimycin (2 days) + cefepim (2 days)	2419	5	alive
2	83	Postop cardiogenic shock	29	VAP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ciprofloxacin (11 days) + ceftazidime (13 days)	4092	6	alive
3	73	Cardiogenic shock	16	VAP	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	piperacillin + tazobactam (4 days)	1492	4	alive
4	63	Peritonitis	16	VAP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Imipenem (7 days)	1427	3	dead
5	42	Peritonitis	10	VAP, peritonitis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	piperacillin+ tazobactam (10 days)	1547	6	alive
6	64	Peritonitis	37	Peritonitis VAP	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> + <i>Enterobacter Cloacae</i> + <i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Enterobacter cloacae</i> + <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	tigecycline + colimycin	2666	3	alive
7	65	Postoperative pneumonia	134	VAP	<i>Streptococcus agalactiae</i>	none	3289	5	alive
8	56	Pneumonia	11	VAP	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> + <i>EBV reactivation</i>	piperacillin + tazobactam (10 days)	4991	4	alive
9	34	Pneumonia	15	VAP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Aspergillus fumigatus</i>	colimycine (15 days) + amikacine (aerosolized) 15 days Voriconazole started	5428	5	alive
10	56	Cervical cellulitis septicemia	13	Perirenal abscess	<i>Staphylococcus aureus</i>	oxacilline + Pefloxacin (12 days)	2056	7	alive
11	60	Fasciitis	38	Fasciitis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Imipenem + amikacine (3 days)	5132	5	alive
12	74	Keto-acidosis	40	VAP, lung abscess, pleuresis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	Imipenem (7 days)	7073	4	Alive
13	82	Rectal Fistulae & fasciitis	9	Tight muscle infection	Gram negative multiple bacteria anaerobes	Piperacillin + tazobactam (4 days) + Imipenem + amikacine (7 days)	2168	3	Alive
Cohort 2									
	Age	Diagnosis at admission	Infection focus	Delay between admission and IFN γ	Microorganism	Antibiotic treatment	SOFA-score at admission	mHLA-DR Expression (MFI)	Outcome
	74	Septic Shock	Abdominal	4	Unknown	Ceftriaxon	12	16.0	Death
	73	"	Abdominal	3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ceftriaxon	8	14.6	Alive
	74	"	Biliary	1	Multi-resistant <i>E coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	Piperacillin / tazobactam, ceftriaxon erytromycin	14	5.6	Alive
	80	"	Abdominal	5	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Candida albicans</i>	Vancomycin and Piperacillin / tazobactam, myfungin / fluconazole	9	73.6	Death

VAP Ventilator-associated pneumonia, EBV Ebstein Barr virus, CMV cytomegalovirus



in mHLA-DR expression (Additional file 4: Figure S2). The medical team decided to restart the IFN γ treatment for 4 days inducing again the resolved infection accompanied by a quick improvement in clinic and in chest CT scan (Additional file 4: Figure S2). After discharge from ICU, 4 patients died at day 52, 86, 108 and day 176 post admission.

In cohort 2, in accordance with the protocol (NCT 01649921) the 1st dose of IFN γ was administered between day 1 and 4 after admission to ICU for septic shock. Table 1 summarizes the baseline characteristics and outcomes. The 2 cohorts were different for several items: the cohort 2 was older with a higher APACHE II score level and dose of norepinephrine infusion at time



of decision to use IFN γ . Figure 2b depicts the individual evolution of mHLA-DR levels expressed in MFI of variations from pre-treatment values. Initial mHLA-DR levels were low (below MFI 20) in 3 out of 4 patients and increased during IFN γ treatment. In one patient the IFN γ -induced a rapid increase in mHLA-DR expression, promptly followed by a sharp decrease of HLA-DR expression, associated with clinical deterioration and death. Two patients died within the 14-days after initiation of IFN γ treatment. No serious adverse events linked to IFN γ treatment were observed.

Pediatric cases

Both had uncontrolled infection after liver transplantation despite the full supportive and adequate microbial therapies. The expression of mHLA-DR demonstrated a sharp increase when IFN γ was administered. The usual immunosuppressive drugs to prevent graft rejection after liver transplantation were maintained. Figure 2 illustrates the evolution of mHLA-DR expression in the case n°2 before, during, and after administration of 20 mcg/subcutaneous injection of IFN γ for 5 days.

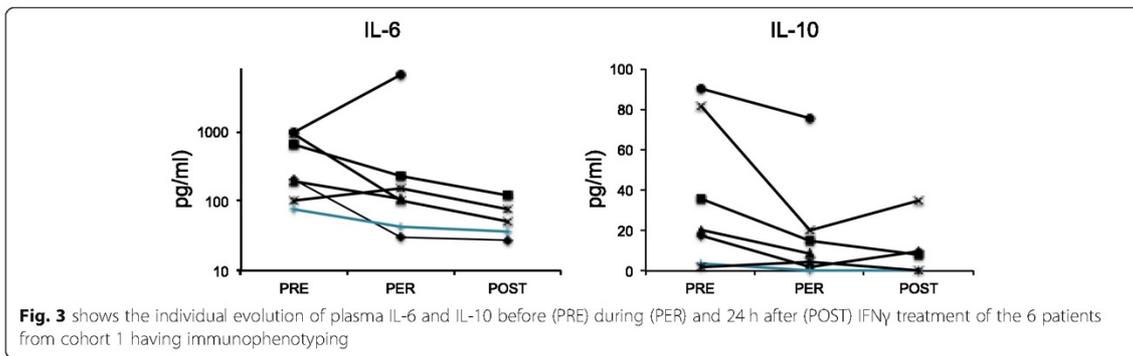
Subgroup for immunological evaluation

Figure 3 summarizes the course of individual plasma IL-6 and IL-10 levels from baseline to the day post IFN γ treatment ($n = 6$ from cohort 1). IL-6 decreased from 464 [201–770] to 108 (89–140) ng/mL ($p = 0.04$) with a

decrease in IL-10 from 29 [12–59] to 9 [1–15] pg/mL ($p = 0.06$). Figure 4 shows the individual evolution of the patients from the cohort 1 having lymphocyte immunophenotyping. Treatment with IFN γ did not modify the %, nor the absolute value of lymphocyte subpopulations, except for NK cells. IFN γ treatment induced a clear trend of decreased absolute value of NK cell subtype from 13 [12–14] to 10 [3–10] ($p = 0.0625$). Figure 5 is a schematic proposal to consider a potential treatment for acute severe immunodepression that could be applied for future randomized control trials.

Discussion

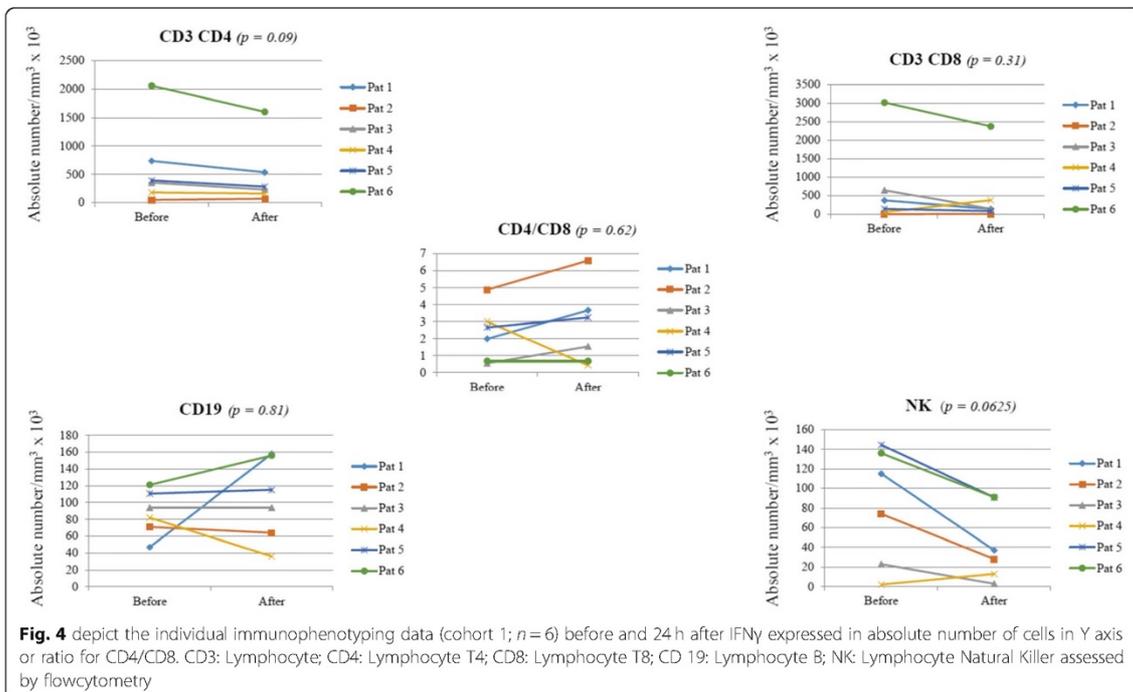
Over the last decades it is increasingly recognized that a large proportion of sepsis patients suffer from a sustained suppression of their immune system [1]. This immune-suppression is associated with reactivation of latent viral infections [20], the development of secondary infections and impaired clinical outcomes [6, 21]. Several pharmacological interventions may restore the immune response, but adequately large clinical trials are currently lacking. We investigated the safety and immunological effects of IFN γ in 17 adult patients reported that IFN γ increased monocytic HLA-DR expression in all except one patient. Treatment with IFN γ did not boost circulating cytokine concentrations: IL-6 and IL-10 concentrations were lower than pretreatment values. It tended to decrease NK-cell proportion without changes for other

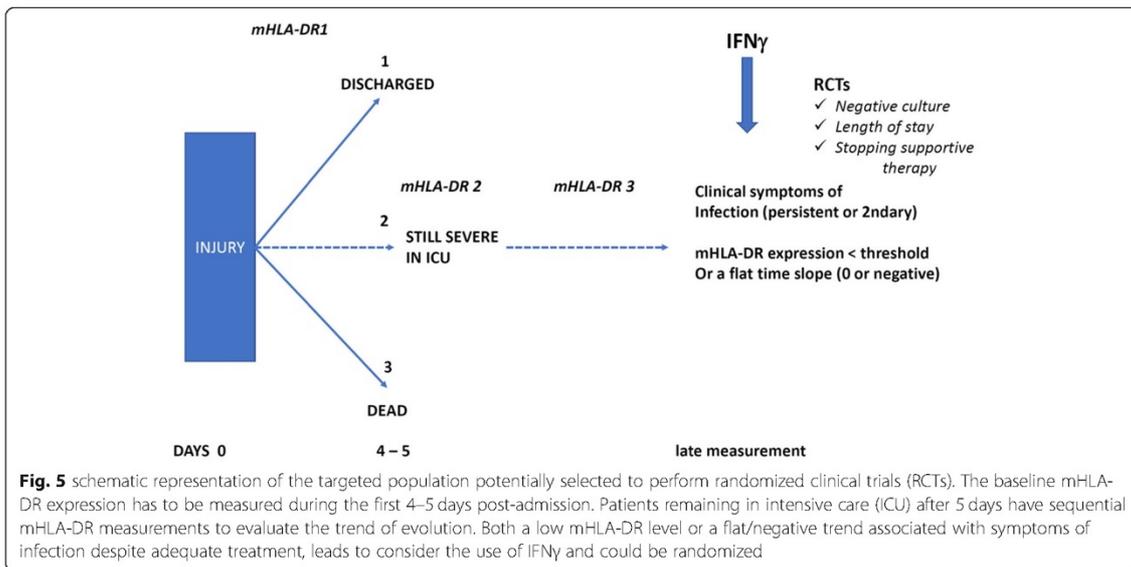


leukocyte subpopulations. In addition, cultures that remained positive prior to IFN γ treatment became negative in all patients. No safety effects judged to be attributable to IFN γ were observed. Overall, survival appeared higher than anticipated in this specific group of immunoparalyzed patients, but clearly the numbers are too small to conclude that the restoration of the immune response is related to better clinical outcome.

The IFN γ used in the present case series was a human type II IFN γ having the advantage to be 100–1000 more active than other interferons [22]. This molecule received the FDA approval for clinical application against chronic granulomatous disease to decrease the severity and number of infections. Beneficial effects of adjuvant

treatment using IFN γ for fungal infections in patients suffering from chronic granulomatous disease [17] HIV [23–25], leukemia [26, 27], and in organ transplant patients [28] were previously reported. The first report using this IFN γ in human bacterial sepsis was made by Docke et al. [9] in 9 septic ICU patients at 100mcg daily dose. Since then, several small case series suffering from opportunistic infections [16] [29] or pediatric case [30, 31] or HIV cases [23–25] have been published. The present case series is the first reporting the use of IFN γ in adult and pediatric bacterial sepsis, including septic shock patients with associated cytokines level modifications and immunophenotyping. The delay to use IFN γ from the ICU hospitalization differed largely within the





2 reported small cohorts. One might argue that the unfavorable outcome in 2 patients of cohort 2 early treated may suggest that IFN γ therapy should not be used too early, even when HLA-DR expression is already suppressed. In the early treated group, the patients are still in the steep part of the survival curve with a high mortality (close to 50%) of severe septic shock patients [32]. Nevertheless, the cases of the cohort 2 early treated (< 4 days after admission for septic shock) had a rapid down-regulation of HLA-DR expression that responded well to IFN γ stimulation for mHLA-DR expression. The lack of positive signal for outcome could be related to a down-regulation adapted to the acute phase with no benefit to administer IFN γ .

The concentrations of circulating cytokines were measured in cohort 1 to examine whether or not the immunostimulating with IFN γ would result in increases in these cytokines, which could have deleterious effects. This was not the case, both circulating IL-6 and IL-10 levels decreased following IFN γ treatment. In accordance, in volunteers exposed to endotoxin twice, treatment with IFN γ restored the suppressed cytokine response during the second endotoxin exposure. So, IFN γ prevents and reverses the *in vivo* induced endotoxin tolerance with no indications of an overshoot response [18]. The modest changes induced by IFN γ in lymphocytes subpopulations were observed, except for absolute number of NK cells. The clear trend of NK cell decrease in our case series may result from a migration into infected tissue or from a reduction in NK cell generation. Being poorly reported, this observation made in a small size cohort should be cautiously interpreted. The reported case series on

invasive fungi infection did not show changes in the total leucocyte and granulocyte numbers when IFN γ -treatment was given change [16].

The predominant effect on innate immunity associated with the moderate changes of adaptive immunity, opens the possibility to use IFN γ even after organ transplantation maintaining the anti-rejection treatment targeting mainly the lymphocytes. It is possible and reasonable to combine the IFN γ treatment with the maintenance of an anti-graft rejection treatment when an infection cannot be controlled.

The clinical benefit of IFN γ treatment appeared favorable in cohort 1 with only 1 death. All cohort except 1 patient improved enough to be discharged from ICU. This observation suggests that IFN γ is most clinically effective if the suppressed immune response is present for a longer period and is associated with new infections. We hypothesized that the duration more than the depth of mHLA-DR downregulation is relevant for the clinician to detect the risk of new infections. This aspect should be verified in a larger population. As reported previously, the IFN γ treatment was well tolerated in our 20 patients with no clearly attributable severe side effects. The monitoring of HLA-DR expression on circulating monocytes appears adequate to follow the immunological efficacy of the compound, a relatively cheap immune monitoring exam to facilitate the clinical decision making.

This case series has important limitations, mostly related to its observational nature and the compassionate use of the drug. First, the 20 collected cases are too limited to draw definitive conclusions about the clinical

benefit of this treatment. However, grouping together the case reports and the other case series results in at least 50 reported cases treated by IFN γ . Overall, an excellent tolerance was reported using a 100 mcg daily in adult. It is still essential to determine the dose-response relationship, and the tolerance of potential repetitive treatment to complete the safety profile of the compound. Despite the small number of cases, it is remarkable that mHLA-DR significantly increased following the first injection and went down again rapidly after treatment cessation. Second, macrophage or monocyte polarization (M1 or M2) has not been tested in our cases, which hampered the understanding of re-programming mechanisms and its impact on monocyte-macrophage polarization.

Conclusion

Sepsis induces suppression of the immune system, associated with susceptibility to secondary infections and impaired clinical outcome. We report cases for whom IFN γ treatment was well-tolerated and improved immune host defense. The increase in monocytic HLA-DR expression did not induce a storm of cytokine release nor a modification in lymphocyte immunophenotyping, except for decrease in absolute number of NK cells. Within the limits of small size cohort, the clinical benefit of IFN γ to stimulate innate immunity in presence of immunosuppression is an attractive track for the future. The Fig. 5 illustrates the potential design for future clinical trials. The primary end-point might be the resolution of infection and/or positive culture and the length of stay in intensive care.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4526-x>.

Additional file 1. Supplementary methods

Additional file 2: Supplementary pediatric cases

Additional file 3: Figure S1. Variations in SOFA score before and after IFN γ treatment in cohort A. Legend: Vertical axis: % of SOFA variations; horizontal axis: days before and after treatment by IFN γ .

Additional file 4: Figure S2. Evolution of pulmonary CT scan over days in patient 8.

Abbreviations

CD: Cluster of Differentiation; HIV: Human Immunodeficiency Virus; HLA-DR: Human Leucocyte Antigen-DR; ICU: Intensive Care Unit; IFN γ : interferon gamma; IL-10: interleukine 10; IL-6: interleukine 6; MFI: Mean Fluorescence intensity; MHC class II: Major Histocompatibility Complex II; NK: Natural Killer; PCR: Polymerase Chain Reaction; PD: Program Death; RCT: Randomized Clinical Trial; SICU: Surgical Intensive Care Unit; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

Acknowledgements

The authors thank the medical team of concerned ICUs, especially Doctor Mathieu Le Dorze.

Authors' contributions

DP, PT and ACL and PP conceived and designed the data collection. DP, ACL, JM, PT, JL, and PP screened and included patients. VF, CB and JL carried out flow cytometry, immunophenotyping, and cytokine measurements. DP, PP, and CD analyzed the data. DP, PP, ACL, JL, PT and JM participated in the data interpretation. DP, ACL, PT and PP wrote the manuscript draft. DP, ACL, PP, CB and FV contributed to the writing of the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript

Funding

In this study, the Cohort 1 did not receive specific funds. It was a part of a global grant from University Paris 7 and "Programme Hospitalier de Recherche Clinique" (PHRC) Assistance Publique-Hôpitaux de Paris on immuno-monitoring in ICU. For, the data were collected along the ethically approved protocol for inflammatory-induced immune modulation. The cohort 2 received a specific funding to perform a RCT at Radboud University, but was prematurely interrupted. For the pediatric cases, no specific funds were obtained.

Supported partially by Grants from INSERM and University Paris 7 2014–2016 for septic patient's data collection. The specific work about cases treated by IFN γ did not receive a specific grant.

Availability of data and materials

According to the ethical medical protection in France, the case data cannot be diffused. The data can be obtained on specific request to the authors.

Ethics approval and consent to participate

The cohort 1 was collected from the data of the large project on "Severe Sepsis and inflammation monitoring" approved by Cochin Hospital Ethics Committee (# CCPPRB 2061), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. For each patient of the cohort 1, a clear explanation of the justification to use IFN γ was given, based on the literature and on the experience of the research clinical team. According to the French law and with the agreement of the Institutional Pharmacy Board, IFN γ was proposed as a compassionate treatment with clear explanation given to the patient's next of kin about the potential risks and benefits.

For each pediatric case, IFN γ administration was a multidisciplinary decision between intensivists, surgeons and hepatologists, which was proposed to the parents as a compassionate treatment. The compassionate therapy by IFN γ was validated by institutional pharmacist after a review of the literature. Decisional process was notified in the hospitalization records and synthesis note with signature on the medical charts.

Consent for publication

Written informed consent was obtained from the parent of the patients for publication of these Case Report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor of this journal.

Competing interests

None of the authors have any competing interests regarding this study. In this study, the support for the immunological assessments was covered by payment of additional immune tests in the global cost for care.

Author details

¹Groupe Hospitalier Saint-Louis Lariboisière, AP-HP, Université Paris 7 Denis Diderot, 2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France. ²UMR INSERM 1160 University Paris 7 Denis Diderot, Paris, France. ³Pediatric Intensive Care and Neonatal Medicine, Bicêtre Hospital, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁴Institute of Integrative Biology of Cell, CNRS, CEA, Univ. Paris Sud, Paris Saclay University, Gif sur Yvette, France. ⁵Departments of intensive care and internal medicine, Radboud university medical center Nijmegen, PO box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands. ⁶Service d'Hématologie Biologique, Pôle B2P, Hôpital Lariboisière, APHP, Paris, France. ⁷Department Intensive Care Medicine, Radboud university medical center Nijmegen, PO box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands.

Received: 8 February 2019 Accepted: 1 October 2019
Published online: 05 November 2019

References

- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(3):260–8.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(12):862–74.
- Goulet-Cheron A, Allaouchiche B, Floccard B, Rimmele T, Monneret G. Early daily mHLA-DR monitoring predicts forthcoming sepsis in severe trauma patients. *Intensive Care Med*. 2015;41(12):2229–30.
- Venet F, Cour M, Demaret J, Monneret G, Argaud L. Decreased monocyte HLA-DR expression in patients after non-shockable out-of-hospital cardiac arrest. *Shock*. 2016;46(1):33–6.
- Klava A, Windsor A, Boylston AW, Reynolds JV, Ramsden CW, Guillou PJ. Monocyte activation after open and laparoscopic surgery. *Br J Surg*. 1997;84(8):1152–6.
- Lukaszewicz AC, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med*. 2009;37(10):2746–52.
- Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD 2nd, Kreisler D, Krupnick AS, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011;306(23):2594–605.
- Docke WD, Hoflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem*. 2005;51(12):2341–7.
- Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 1997;3(6):678–81.
- Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(4):477–83.
- Monneret G, Venet F, Meisel C, Scheffold JC. Assessment of monocytic HLA-DR expression in ICU patients: analytical issues for multicenter flow cytometry studies. *Crit Care*. 2010;14(4):432.
- Pickkers P. Simultaneously mounted pro- and anti-inflammatory host response relates to the development of secondary infections in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(4):406–7.
- Meisel C, Scheffold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(7):640–8.
- Francois B, Jeannot R, Daix T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, Monneret G, Rimmele T, Blood T, Morre M, et al. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight*. 2018;3:5.
- Hotchkiss R, Olston E, Yende S, Angus D, Moldawer L, Crouser E, Martin G, Coopersmith C, Brakenridge S, Mayr F, et al. Immune checkpoint inhibition in sepsis: a phase 1b randomized, placebo-controlled, single ascending dose study of Antiprogrammed cell death-ligand 1 antibody (BMS-936559). *Crit Care Med*. 2019;47(5):632–42.
- Delsing CE, Gresnigt MS, Leentjens J, Preijers F, Frager FA, Kox M, Monneret G, Venet F, Bleeker-Rovers CP, van de Veerdonk FL, et al. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect Dis*. 2014;14:166.
- A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. *N Engl J Med* 1991; 324(8):509–516.
- Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LA, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(9):838–45.
- Payen DM, Guilhot J, Launey Y, Lukaszewicz AC, Kaaki M, Veber B, Pottecher J, Joannes-Boyau O, Martin-Lefevre L, Jabaudon M, et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in patients with septic shock due to peritonitis: a multicenter randomized control trial. *Intensive Care Med*. 2015;41(6):975–84.
- Kaufmann SHE, Dorhoi A, Hotchkiss RS, Bartenschlager R. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(1):35–56.
- Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohe J, Vanhems P, Monneret G. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med*. 2010;36(1):1859–66.
- Razaghi A, Owens L, Heimann K. Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: impacts of production platforms and glycosylation. *J Biotechnol*. 2016;240:48–60.
- Bodasing N, Seaton RA, Shankland GS, Pithie A. Gamma-interferon treatment for resistant oropharyngeal candidiasis in an HIV-positive patient. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(5):765–6.
- Jarvis JN, Meintjes G, Rebe K, Williams GN, Bicanic T, Williams A, Schutz C, Bekker LG, Wood R, Harrison TS. Adjunctive interferon-gamma immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial. *AIDS*. 2012;26(9):1105–13.
- Riddell LA, Pinching AJ, Hill S, Ng TT, Arbe E, Lapham GP, Ash S, Hillman R, Tchamourov S, Denning DW, et al. A phase III study of recombinant human interferon gamma to prevent opportunistic infections in advanced HIV disease. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2001;17(9):789–97.
- Dignani MC, Rex JH, Chan KW, Dow G, de Magalhaes-Silverman M, Maddox A, Walsh T, Anaissie E. Immunomodulation with interferon-gamma and colony-stimulating factors for refractory fungal infections in patients with leukemia. *Cancer*. 2005;104(1):199–204.
- Poynton CH, Barnes RA, Rees J. Interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for the treatment of hepatosplenic candidosis in patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis*. 1998;26(1):239–40.
- Armstrong-James D, Teo IA, Shrivastava S, Petrou MA, Taube D, Dorling A, Shaunak S. Exogenous interferon-gamma immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients. *Am J Transplant*. 2010;10(8):1796–803.
- Nakos G, Malamou-Mitsi VD, Lachana A, Karassavoglou A, Kitsioulis E, Agnandi N, Lekka ME. Immunoparalysis in patients with severe trauma and the effect of inhaled interferon-gamma. *Crit Care Med*. 2002;30(7):1488–94.
- Leentjens J, Gresnigt MS, van de Veerdonk FL, Kox M, Kullberg BJ, Pickkers P, Brouwer AE, Netea MG. Adjuvant interferon-gamma immunotherapy in a patient with progressive cerebral Nocardia abscesses. *Int J Infect Dis*. 2017;59:25–8.
- Tissieres P, Ochoda A, Dunn-Siegrist I, Drifte G, Morales M, Pfister R, Berner M, Pugin J. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon-gamma. *PLoS One*. 2012;7(3):e32863.
- Sweeney TE, Wong HR. Risk stratification and prognosis in Sepsis: what have we learned from microarrays? *Clin Chest Med*. 2016;37(2):209–18.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



2 Les phénotypes myéloïdes dans les cas graves de COVID-19 prédisent l'apparition d'infection secondaire et la mortalité : une étude pilote

2.1 Contexte

La réponse dérégulée de l'hôte dans les formes graves de maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), qui fait directement référence au concept de dysrégulation immunologique associée au sepsis, semble être une signature forte des formes graves de cette infection. Le phénotypage des cellules myéloïdes est décrit pour le diagnostic de l'immunodépression induite par le sepsis, mais n'a pas été bien caractérisé dans la maladie liée au COVID-19. L'objectif de cette étude était d'analyser les caractéristiques phénotypiques des cellules myéloïdes et d'évaluer leurs relations avec la survenue d'une infection secondaire et la mortalité chez les patients atteints de COVID-19 admis dans une unité de soins intensifs

2.2 Description de l'étude

Il s'agissait d'une analyse rétrospective des phénotypes des cellules myéloïdes circulantes de patients adultes atteints d'une forme sévère de la maladie à COVID-19. Le phénotypage des cellules immunitaires circulantes était effectué par cytométrie de flux quotidiennement pour l'analyse de routine et deux fois par semaine pour l'analyse des sous-populations de lymphocytes et de monocytes, ainsi que pour l'expression de mHLA-DR.

2.3 Résultats et conclusion

Sur les 29 patients adultes gravement malades atteints de COVID-19 analysés, 12 (41,4%) avaient développé une infection secondaire et six patients étaient décédés pendant leur séjour. La cinétique de mHLA-DR était significativement différente

entre les patients développant une infection secondaire et ceux n'en développant pas, respectivement au jour 5-7 et 8-10 après l'admission. Le ratio des cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) par rapport au nombre total de monocytes était associé à la mortalité à 28 et 60 jours. Ces caractéristiques myéloïdes suggèrent trois phénotypes : les monocytes/macrophages hyperactivés étaient significativement associés à la mortalité, tandis que l'immunodépression persistante était associée à la survenue d'une infection secondaire, par rapport à l'immunodépression transitoire. En conclusion, les phénotypes myéloïdes des patients COVID-19 gravement malades peuvent être associés au développement d'une infection secondaire et à la mortalité à 28 et 60 jours d'hospitalisation

RESEARCH

Open Access



Myeloid phenotypes in severe COVID-19 predict secondary infection and mortality: a pilot study

Clémence Marais^{1,2}, Caroline Claude^{1,2}, Nada Semaan^{1,2}, Ramy Charbel¹, Simon Barreault^{1,2}, Brendan Travert^{1,3}, Jean-Eudes Piloquet^{1,3}, Zoé Demailly⁴, Luc Morin^{1,2}, Zied Merchaoui¹, Jean-Louis Teboul⁴, Philippe Durand¹, Jordi Miatello^{1,2} and Pierre Tissières^{1,2,5*}  for The COVID-19 Immune Suppression (CLOVIS) Study Group

Abstract

Background: De-regulated host response to severe coronavirus disease 2019 (COVID-19), directly referring to the concept of sepsis-associated immunological dysregulation, seems to be a strong signature of severe COVID-19. Myeloid cells phenotyping is well recognized to diagnose critical illness-induced immunodepression in sepsis and has not been well characterized in COVID-19. The aim of this study is to review phenotypic characteristics of myeloid cells and evaluate their relations with the occurrence of secondary infection and mortality in patients with COVID-19 admitted in an intensive care unit.

Methods: Retrospective analysis of the circulating myeloid cells phenotypes of adult COVID-19 critically ill patients. Phenotyping circulating immune cells was performed by flow cytometry daily for routine analysis and twice weekly for lymphocytes and monocytes subpopulations analysis, as well as monocyte human leukocyte antigen (mHLA)-DR expression.

Results: Out of the 29 critically ill adult patients with severe COVID-19 analyzed, 12 (41.4%) developed secondary infection and six patients died during their stay. Monocyte HLA-DR kinetics was significantly different between patients developing secondary infection and those without, respectively, at day 5–7 and 8–10 following admission. The monocytes myeloid-derived suppressor cells to total monocytes ratio was associated with 28- and 60-day mortality. Those myeloid characteristics suggest three phenotypes: hyperactivated monocyte/macrophage is significantly associated with mortality, whereas persistent immunodepression is associated with secondary infection occurrence compared to transient immunodepression.

Conclusions: Myeloid phenotypes of critically ill COVID-19 patients may be associated with development of secondary infection, 28- and 60-day mortality.

Keywords: COVID-19, Sepsis-induced immunodepression, Secondary infection, mHLA-DR, Myeloid-derived suppressor cells

Introduction

Critically ill patients with COVID-19 are now recognized to develop frequently secondary bacterial infection with an incidence ranging between 14 and 25% [1, 2]. Among the contributing factors for secondary infections, prolonged ICU stay is well established, but environmental conditions are known to greatly influence its

*Correspondence: pierre.tissieres@aphp.fr

¹ Pediatric « Adult COVID-19-Converted » Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP Paris Saclay University, Bicêtre Hospital, 78, Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France
Full list of author information is available at the end of the article



©The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

development. The host response to acute and/or prolonged aggression is well recognized to participate in critical illness-induced immunodepression and its clinical consequences [3]. Both innate and adaptive immune signatures characterize this condition, but myeloid function and phenotypic profiles are the most robust predictors of acquisition of secondary infections and mortality [4].

Monocytes have the capacity to detect aggression and danger signals, to trigger inflammation and to initiate resolution of inflammation. This extreme functional plasticity is closely associated with myeloid phenotypes throughout myelopoiesis and maturational process modifications. Various inflammatory/infectious signals (e.g., calprotectin, Interleukin (IL)-6, Toll Like Receptors (TLR) agonists) are identified to reorient and promote release from the bone marrow of immature myeloid cells that suppress both innate and adaptive immune response [5]. Those cells, named myeloid-derived suppressor cells (MDSC), are now well identified to participate in the host response to infection by blocking T lymphocyte and natural killer cells proliferation, and production of high amount of immunosuppressive cytokine such as IL-10. In addition, the resulting pro-/anti-inflammatory function of monocytes is globally reflected by the level of surface expression of human leukocyte antigen (HLA)-DR [6] which is a highly predictive of secondary infection development and mortality in patients with sepsis [7, 8]. Increasing evidence suggests a central role of myeloid cells and of severe immunosuppression in the pathogenesis of severe COVID-19 [9–11].

Hereby, we aimed at defining the myeloid cells phenotypes during the first 2 weeks following ICU admission of critically ill COVID-19 and explore their relations with development of secondary infections, 28- and 60-day mortality.

Methods

All critically ill adult patients with confirmed COVID-19 (positive RT-PCR for SARS-CoV-2 and suggestive chest CT-scan) admitted to the Pediatric ICU of the Bicêtre Hospital, AP-HP Paris Saclay University, between March and April 2020 were included. Due to the shortage of adult ICU beds, 16 PICU beds were converted to admit adult COVID-19 critically ill patients and staffed with the PICU professionals reinforced by professionals coming from preserved French regions [12]. A senior adult intensivist (JLT) completed the team. All patients were prospectively included in the CLOVIS cohort study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04544878). The study (French study classification: MR004) was approved by the local IRB and French Data Protection Authority (CNIL registration number: 2219981) waiving the need

of written consent. All patients or relatives received information on the study and could refuse to participate at any time. Clinical characteristics including age, gender, comorbidities, occurrence of organ failure, infective complications and related microbiological documentation, length of stay, 28- and 60-day mortality were obtained. Biological characteristics included on admission ferritin, brain natriuretic peptide, troponin T, complement factors, immunoglobulins and sub-classes, daily standard blood workup, and twice weekly non-specific inflammatory markers (e.g., C-reactive protein, procalcitonin), circulating cell phenotyping (complete cell count, T cells and subtypes, B cells, natural killer cells, monocytes and subtypes, neutrophils and subtypes) and monocyte histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR expression measurement (anti-HLA-DR/anti-monocyte Quantibrite assay, BD Biosciences, San Jose, USA). Data were reported at admission, and at four periods within the first 2 weeks: days 1–4, days 5–7, days 8–10 and days 11–14. Circulating cell phenotyping was performed using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) anticoagulated blood. Detailed antibodies used for myeloid phenotyping are reported elsewhere (see Additional file 1: Table S1). Monocyte subsets analysis was based on HLA-DR and CD11b expression in CD19⁻CD14⁺CD15⁻ cells. Among these, monocytes myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC) were identified as CD11b⁺HLA-DR⁻. Thresholds selected for HLA-DR “low-immunosuppressed” group was set at <15,000 antibody per cell (AB/C) and “high-elevated” group >30,000 AB/C according to recent published data in COVID-19 critically ill patients [11]. Standard immunophenotyping was performed for lymphocytes T and subclass, NK cells, lymphocytes B, neutrophils. The primary endpoint was the occurrence of secondary infection during the ICU stay as defined by IDSA definitions [13, 14]. The secondary endpoint was 28- and 60-day mortality.

Data are described as number (%) and median (interquartile range (IQR) for categorical and continuous variables, respectively). Comparison of baseline characteristics between patients with a blood sample was done using the Fisher’s exact test or the Chi-square test, as appropriate. The Wilcoxon Mann–Whitney *U* test was used to determine differences between immunological variables at each time point. We measured the discrimination of M-MDSC to total monocytes ratio using the area under the receiver operating characteristics (AUROC) curve. The best threshold was obtained with the calculation of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and the Youden’s index ($Y = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$). A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism, v 8.4.2 (GraphPad Software, LLC).

Results

From March 26 to April 15, 2020, 32 critically ill adult patients with suspected COVID-19 were admitted to the Pediatric ICU of the Bicêtre Hospital, AP-HP Paris Saclay University. Out of the 32 patients, one died within the first 6 h following admission and two ultimately had negative SARS-Cov-2 PCR and were definitively considered as non-COVID-19 patients (Fig. 1). Twenty-nine patients were analyzed and their characteristics displayed in Table 1. Secondary infection occurred in 12 patients (41.4%) and six patients (20.7%) died in the ICU. Length of stay in the ICU ranged between 7 and 28 days. At the end of the ICU stay, all survivors were transferred to an adult stepdown unit or wards of our hospital. Five patients were transferred to a medical unit with ventilator rehabilitation facilities. Secondary infections were primarily ventilator-associated pneumonia including pulmonary abscess ($n=2$) and *Aspergillus* spp pneumonia ($n=2$) (see Additional file 1: Table S2). On univariate analysis, age, SAPS II, comorbidities and mechanical ventilation were significantly different between patients developing or not secondary infection (Table 1). No biologic markers but NK cells count, monocytes count and M-MDSC to total monocytes ratio significantly differed between both groups.

Five patients had persistently high mHLA-DR throughout their ICU stay. In the remaining 24 patients, mHLA-DR at admission was similar, but patients with secondary infection had a persistently low mHLA-DR level throughout the first 2 weeks, whereas those without secondary infection significantly increased their mHLA-DR within the first 5–7 days after admission (median range increase from day 1–4: 14,826 to 25,355 AB/C at day 5–7 and 14,826 to 27,082 at day 8–10 AB/C) (Fig. 2a). Interestingly, no significant change in mHLA-DR occurs in both groups between days 5 to 10, suggesting that most of the myeloid response is set in the first days following admission (see Additional file 1: Figure S1). This significant deviation of mHLA-DR between patients developing or not secondary

infection occurred 1 to 3 days before infection diagnosis was made. No significant difference in mHLA-DR was found between survivors and deceased ones during the study (Fig. 2b). No statistical difference in the percentage of M-MDSC to total circulating monocytes between patients with or without secondary infection was observed (Fig. 3a). M-MDSC proportion to total circulating monocytes was associated with 60-day survival (AUROC curve = 0.70, 95% CI 0.39 to 1) with M-MDSC to total monocytes being significantly lower at admission in patients alive at day 60 ($n=10/29$, $p=0.044$) (Fig. 3b). A cut-off value of 21% (Youden index = 0.54) was associated with a sensitivity of 67% and specificity of 87%.

Circulating myeloid cell phenotyping suggested three different groups of patients according to the evolution of the mHLA-DR rate: patients with persistently high mHLA-DR > 30,000 AB/C during the study (cluster 1), patients with persistently low mHLA-DR < 15,000 AB/C after day 5–7 (cluster 2) and patients with rising mHLA-DR > 15,000 AB/C after day 5–7 (cluster 3) (Table 2). On admission neither clinical nor biochemical parameters, but circulating cell phenotypes, differentiated the three phenotypes. Although on admission leukocytes count were similar (Fig. 4), patients from cluster 1 showed a non-significant trend toward early increased in leukocytes (Wilcoxon sign rank test, $p=0.06$). Since patient from cluster 1 always displayed no to low M-MDSC (range: 0 to 3.19%), analysis of M-MDSC proportion to total circulating monocytes, without cluster 1 patients, was significantly associated with 28 days mortality ($p=0.003$, AUROC curve = 0.94, 95% CI 0.84 to 1; cut-off value 18%, Youden Index = 0.85). The three phenotypes were associated with clinical outcomes: patients from cluster 1 displayed a hyperactivated monocytes/macrophage (HAMM) phenotype associated with the highest mortality, whereas those from cluster 2 and 3 displaying either prolonged immunodepression (PID), and transient immunodepression (TID) were differentially associated with occurrence of secondary infection (Table 3). Interestingly, the development of a secondary infection among the M-MDSC to total monocytes ratio > 18% group only occurred in patients with PID.

Although few patients were included in therapeutic institutional immunotherapy study [15], independently to the myeloid phenotypes, one patient with HAMM and confirmed macrophage activation was treated with compassionate anti-IL6 therapy (tocilizumab) and successfully weaned from ECMO within 48 h and fully recovered.

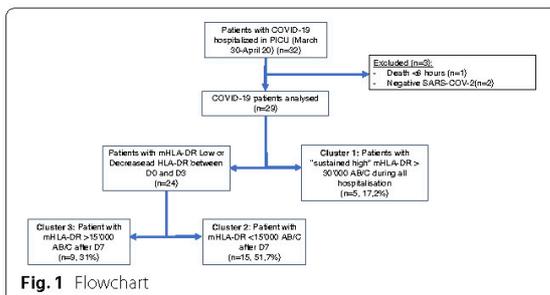


Table 1 Patients characteristics

	No secondary infection (n = 17)	Secondary infection (n = 12)	p value
Age (years)	52 (47–54)	64 (62–66)	0.005
BMI (kg/m ²)	28.5 (26.3–31.4)	29.3 (27.4–33)	0.44
Gender male	10 (58.8)	10 (83.3)	0.16
SOFA score			
Day 1	7 (4–11)	10 (7–14)	0.095
Day 3	7 (4–10)	11 (7–14.5)	0.024
Day 7	6 (4.5–7)	11 (8–14.5)	0.013
Day 10	3 (3–6)	11 (9–13.5)	0.02
SAPS II score			
Day 1	45 (27–58)	59 (54–67)	0.03
Day 3	48 (24–55)	62 (58–64)	0.04
Day 7	40 (25–49)	60(58–69)	0.02
Day 10	23 (13–35)	65 (56–70)	0.001
Comorbidities			
Cardiologic	5 (29.4)	10 (83.3)	0.004
Hypertension	5 (100)	9 (90)	–
Hypertrophic cardiomyopathy	1 (20)	0	–
Peripheral artery occlusive disease	1 (20)	1 (10)	–
Ischemic cardiopathy	0	2 (20)	–
Pneumologic	2 (11.8)	1(8.3)	0.77
Neurologic	2 (11.8)	3 (25)	0.35
Immunologic	3 (17.6)	1 (8.3)	0.47
Metabolic	7 (41.2)	8 (66.7)	0.18
Supportive care			
Norepinephrine	5 (29.4)	5 (41.7)	0.49
Mechanical ventilation	12 (70.6)	12 (100)	0.04
CRRT	3 (17.6)	5 (41.7)	0.154
Immunotherapy	1 (5.8)	2 (33.3)	0.55
Laboratory values at admission			
Leucocytes (/mm ³)	7520 (5970–9330)	11,910 (7160–14,750)	0.082
Neutrophils (/mm ³)	6420 (4880–8310)	10,010 (6238–12,225)	0.09
Immature neutrophils (%)	4 (2.57–7.54)	4.9 (2.5–6.1)	0.98
Lymphocytes (/mm ³)	800 (600–1191)	1235 (663–1442)	0.143
CD4 (/mm ³)	330 (222.5–526.5)	333 (240.5–481.5)	0.917
CD8 (/mm ³)	167 (114.5–257)	346 (163–399.5)	0.102
NK (/mm ³)	74 (63.25 -109.25)	127 (95–249)	0.046
B (/mm ³)	136 (97.5–279)	132 (100–333.5)	0.827
Monocytes (/mm ³) ^a	198.7 (81.5–284)	328.6 (170.9–453.8)	0.03
mHLA-DR (AB/C)	17,737 (10,060–32,503)	11,877 (7039–22,702)	0.3
M-MDSC (%)	3.8 (0.95–13.96)	10.25 (4.14–29.32)	0.04
Immunoglobulin G (g/L)	9.87 (7.6–11.35)	10.8 (8.71–13.80)	0.364
Immunoglobulin M (g/L)	1.22 (0.7–1.39)	0.81 (0.63–1.30)	0.427
Immunoglobulin A (g/L)	2.73 (2.21–3.3)	2.49 (2.21–5.02)	0.584
C3 (g/L)	1.28 (1.05–1.43)	1.4 (1.15–1.45)	0.568
C4 (g/L)	0.27 (0.23–0.36)	0.29 (0.22–0.34)	0.765
CH50 (U/mL)	70 (56.5–73.3)	70 (57–73)	0.943
Platelets ($\times 10^3$ /mm ³)	271(182–340)	444(263–503.7)	0.097
Fibrinogen (mg/dL)	7.3 (6.5–8.1)	8.1 (7–8.3)	0.28
D-dimers (g/dL)	2145 (1100–3595)	2859 (1612–2870)	0.29

Table 1 (continued)

	No secondary infection (n = 17)	Secondary infection (n = 12)	p value
Ferritin (µg/L)	1223 (818.25–1378.5)	1691 (303–4406.5)	0.287
Creatinine (µmol/L)	67 (50–109)	88.5 (65.8–145)	0.25
Total bilirubin (µmol/L)	9 (6–12)	11 (5.75–21.5)	0.73
PCT (ng/mL)	0.64 (0.34–2.77)	0.71 (0.36–3.22)	0.9
CRP (mg/L)	131.5 (89.7–210.5)	188 (98.5–265)	0.34
Outcome			
28-day mortality	3 (17.6)	3 (25)	0.63
60-day mortality	5 (29.4%)	6 (50)	0.26
PICU length of stay	10 (7–15)	26 (21.5–28)	0.0001

Values are expressed as median (IQR) or number (%)

BMI, body mass index; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; SAPS, Simplified Acute Physiological Score; CRRT, continuous renal replacement therapy; CD, cluster of differentiation; mHLA-DR, monocyte histocompatibility leucocyte antigen-DR; M-MDSC, monocyte myeloid-derived suppressor cell (CD11b⁺HLA-DR⁺), C, complement; CH50, total complement activity; PCT, procalcitonin; CRP, C-reactive protein; PICU, pediatric intensive care unit

^aTotal monocytes: CD19⁻CD14⁺CD15⁻, monocytes subtypes based on CD11b and HLA-DR

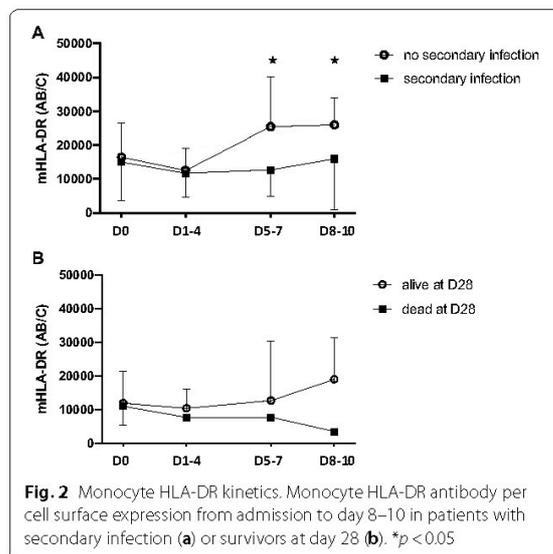


Fig. 2 Monocyte HLA-DR kinetics. Monocyte HLA-DR antibody per cell surface expression from admission to day 8–10 in patients with secondary infection (a) or survivors at day 28 (b). *p < 0.05

Discussion

This pilot study identified two prototypic myeloid characteristics associated in critically ill COVID-19 adult patients with the occurrence of secondary infection and mortality. Monocyte HLA-DR kinetics and presence of M-MDSC, both illustrating myeloid antigen presentation and immune cell suppressive function, showed specific profiles in severe COVID-19.

In contrast to published series suggesting a systematic decrease or low (<15,000AB/C) mHLA-DR in severe COVID-19 [11], we identified three distinct mHLA-DR kinetics, suggestive of three clusters of patients (Fig. 1). Analysis of mHLA-DR kinetics has proven to be an

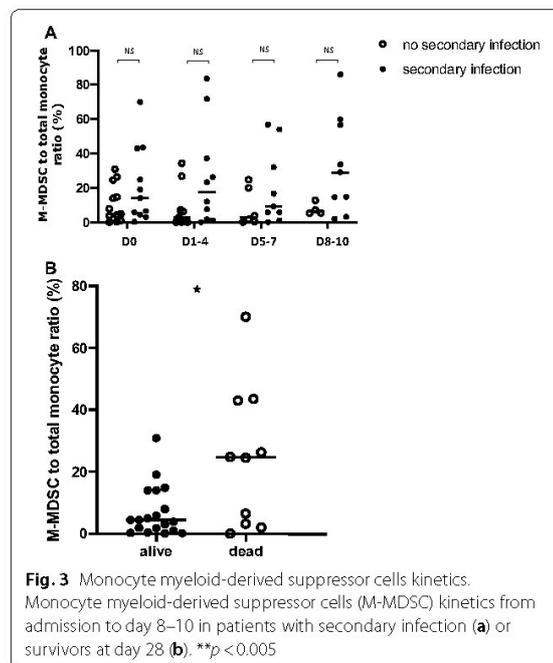


Fig. 3 Monocyte myeloid-derived suppressor cells kinetics. Monocyte myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC) kinetics from admission to day 8–10 in patients with secondary infection (a) or survivors at day 28 (b). **p < 0.005

accurate characterization of the immunological adaptation during critical illnesses. Although in COVID-19, mHLA-DR level seems not as low as what is seen in septic shock (<8000 AB/C), in our study, profile kinetics seen in cluster 2 (PID) and cluster 3 (TID) were differentially associated with the development of secondary infection, which is in line with published experience in sepsis [16]. A decrease in mHLA-DR in severe COVID-19 was shown in both adults and children [17–21].

Table 2 Severe COVID-19 myeloid phenotypes at admission

	Cluster 1 (HAMM, n = 8)	Cluster 2 (PID, n = 18)	Cluster 3 (TID, n = 9)	p
Age (years)	44 (43–57)	63 (59–67)	55 (53–59)	0.04
BMI (kg/m ²)	27.6 (26.3–31.5)	29.4 (26.7–31.8)	29.2 (26.4–31.4)	0.94
Gender male	3 (60%)	12 (66%)	5 (55%)	0.07
SOFA score	10 (2–14)	7 (6.5–12)	8 (6–12)	0.96
SAPS II score	57 (22–59)	55 (48–65)	54 (45–58)	0.63
Laboratory values				
Leucocytes (/mm ³)	8940 (7520–15,600)	8370 (6800–11,260)	10,380 (5970–12,740)	0.74
Neutrophils (/mm ³)	5180 (4770–8310)	6320 (5525–11,415)	9770 (7960–11,080)	0.66
Immature neutrophils (%)	7.3 (4–23)	3.3 (2.7–6.7)	4.6 (1.1–7.2)	0.39
Lymphocytes (/mm ³)	1191 (970–1370)	800 (620–1340)	860 (780–1220)	0.87
CD4 (/mm ³)	438 (308–670)	396 (230–529)	312 (226–339)	0.44
CD8 (/mm ³)	246 (74–356)	268 (110–376)	213 (162–243)	0.93
NK (/mm ³)	69 (63–92)	102 (65–167)	111 (91.5–193.5)	0.24
B (/mm ³)	301 (42–313)	132 (122–283)	127 (89–201)	0.80
Monocytes (/mm ³) ^a	110.2 (51.6–284)	307.4 (169.4–350.3)	198.7 (81.5–270.3)	0.2
mHLA-DR (AB/C)	46,340 (41,550–48,017)	10,060 (6329–16,281)	15,646 (10,873–28,568)	0.002
M-MDSC (%)	1.8 (0.4–1.87)	13.9 (5.4–27.8)	3 (0.9–14.8)	0.009
CD11b ⁺ HLA-DR ⁺	96.2 (95.8–97.95)	82.2 (69.0–94.6)	96.9 (85.2–14.8)	0.01
CD11 ⁻ HLA-DR ⁺	0.37 (0–1.8)	0 (0–0.3)	0 (0–0)	0.28
LNR (%)	20.3 (11–26.4)	12.6 (9.2–17.4)	10.7 (9.8–17.1)	0.45
LMR (%)	9.1 (3.4–10.8)	3.5 (2.6–4.3)	3.1 (2.2–5.2)	0.2
Immunoglobulin G (g/L)	7.66 (7.54–10.10)	9.93 (8.02–12.5)	11.5 (9.80–14.30)	0.30
Immunoglobulin M (g/L)	1.21 (0.90–1.34)	0.81 (0.63–1.24)	1.3 (0.90–1.55)	0.36
Immunoglobulin A (g/L)	3.40 (1.94–4.32)	2.63 (2.21–3.71)	2.80 (2.20–3.30)	0.99
C3 (g/L)	1.32 (1.09–1.53)	1.28 (1.09–1.43)	1.39 (1.23–1.44)	0.73
C4 (g/L)	0.25 (0.23–0.25)	0.24 (0.16–0.35)	0.29 (0.28–0.36)	0.40
CH50 (U/mL)	68 (63–69)	64 (52.5–73)	79 (72–83)	0.16
Platelets ($\times 10^3$ /mm ³)	340 (333–387)	308 (237–482)	242 (182–312)	0.73
Fibrinogen (mg/dL)	8.1 (6.5–8.1)	7.2 (6.5–8.1)	8.1 (6.7–8.3)	0.81
D-dimers (g/dL)	2875 (2027.5–3370)	1620 (1480–3510)	2610 (1880–4000)	0.86
Ferritin (μ g/L)	507 (418–919)	1416 (768–1730)	1313 (729–1675)	0.30
Creatinine (μ mol/L)	67 (42–172)	68 (57–121)	85 (60–109)	0.84
Total bilirubin (μ mol/L)	5 (5–6)	11 (6–17)	10 (8–21)	0.22
PCT (ng/mL)	0.57 (0.47–2.95)	0.54 (0.19–1.74)	0.88 (0.64–2.77)	0.29
CRP (mg/L)	99 (74.5–117)	163 (85–229)	206.5 (149.8–233)	0.33
Outcomes				
28-day mortality	2 (40%)	2 (13%)	2 (22%)	0.36
60-day mortality	2 (40%)	5 (33%)	3 (33%)	0.24
PICU length of stay	7 (6–10)	20 (11–24)	15 (11–23.5)	0.30

Values are expressed as median (IQR) or number (%)

BMI, body mass index; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; CD, cluster of differentiation; LNR, lymphocytes-to-neutrophils ratio; LMR, lymphocytes-to-monocytes ratio; mHLA-DR, monocyte histocompatibility leucocyte antigen-DR; M-MDSC, monocyte myeloid-derived suppressor cell (CD11b⁺HLA-DR⁺), C, complement; CH50, total complement activity; PCT, procalcitonin; CRP, C-reactive protein; PICU, pediatric intensive care unit

^aTotal monocytes: CD19⁻ CD14⁺ CD15⁻, monocytes subtypes based on CD11b and HLA-DR

Spinetti et al. showed that critically ill patients initially admitted in general wards and secondarily transferred to the ICU, had a higher mHLA-DR than those directly admitted to the ICU [17]. Similarly, Moratto et al. showed

that COVID-19 hospitalized patients progressing to critical illness had lower mHLA-DR level [18]. In a cohort of 157 COVID-19 patients, Wang et al. showed that the 62 patients who died had a significantly decreased

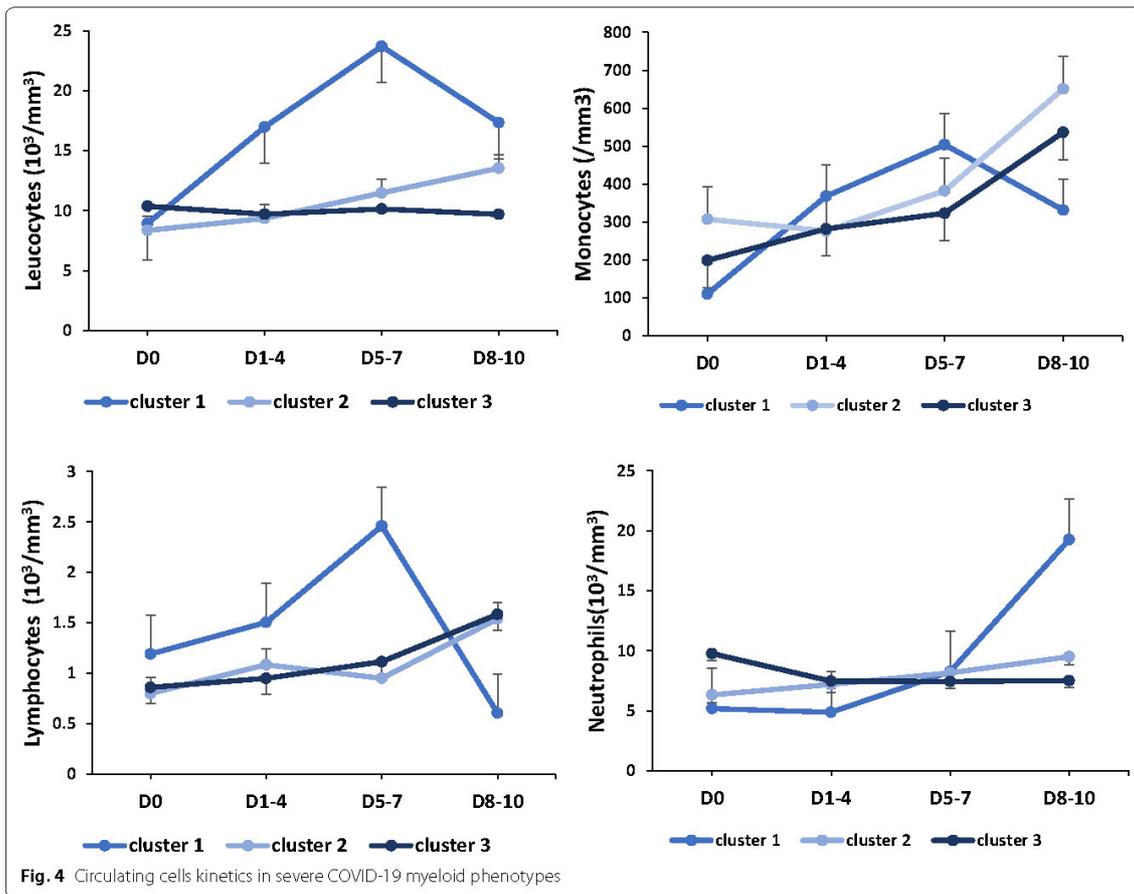


Fig. 4 Circulating cells kinetics in severe COVID-19 myeloid phenotypes

Table 3 Myeloid phenotypes diagnostic criteria in severe COVID-19 and targeted investigation and therapy

	Hyper-activated monocytes/macrophage (HAMM)	Transient immune-depression (TID)	Persistent immune-depression (PID)
Dynamic diagnostic criteria			
M-MDSC day 0 ^{a,b}	< 5%		
mHLA-DR day 0 ^a	> 30,000 AB/C	< 30,000 AB/C	
mHLA-DR day 5–7 ^a		> 15,000 AB/C	< 15,000 AB/C
Targeted investigation	Screen for MAS-like: myelogram		Track VAP
Targeted therapy	If MAS-like, consider immunotherapy (e.g. Anti-IL6)		Consider empiric antibiotics by day 5–7

M-MDSC, monocytes myeloid-derived suppressor cell to total monocytes ratio defined as $CD19^- CD14^+ CD15^- CD11b^+ HLA-DR^-$ cells/ $CD19^- CD14^+ CD15^-$ cells; mHLA-DR, monocytes Human leukocyte antigen-DR; AB/C, antibody per cell; MAS, macrophage activation syndrome; VAP, ventilator-associated pneumonia

^a Following ICU admission

^b M-MDSC > 18% is associated with 28-day mortality in PID and TID, with PID systematically associated with secondary infection

mHLA-DR after 10 days [19]. Interestingly, preliminary report in children suggested that mHLA-DR was strongly decreased in children with severe COVID-19

multisystem inflammatory syndrome in children, but could not evidence an association with mortality [20]. In our study, mHLA-DR kinetics between deceased and

survivors were not significantly different, although this result could have been hampered by the limited follow-up period.

In contrast to published experience, we identified a third cluster of patients, with persistently high mHLA-DR, suggestive of protracted monocyte activation phenotype. This mHLA-DR kinetic, although less frequent, was also identified in one series [17]. In our cohort, those patients had severe systemic inflammation, high ferritin, elevated fibrinogen and lymphopenia and in one patient, confirmed macrophage activation on bone marrow analysis reinforcing a potentially “hyperactivated monocyte/macrophage” (HAMM) phenotype. Use of mHLA-DR to identify critically ill patients with macrophage activation syndrome was recently suggested and may prove to be an effective screening criterion in patients with severe COVID-19 and suspected HAMM mimicking macrophage activation syndrome [22]. This observation further completed earlier observations suggesting that COVID-19 may be associated with macrophage activation-like syndrome [23–25].

Although not unique, impairment of myeloid response is increasingly recognized in COVID-19. Relative disappearance of non-classical CD14^{low}CD16^{high} monocytes, seems to be characteristics of SARS-CoV-2 infection, not seen in other viral infections, and may be associated with severity [9, 26]. As shown, a second characteristic seen in severe COVID-19 is the decrease in HLA-DR expression on CD14^{high} monocytes that could be associated with altered responsiveness of circulating monocyte to TLRs bacterial agonists [27]. There is currently significant arguments to suggest that emergency myelopoiesis occurs in severe COVID-19. Silvin et al. showed massive amounts of calprotectin and immature myeloid precursors raising the hypothesis of a probable expansion of myeloid-derived suppressor cells during SARS-Cov-2 infection [5, 9]. Hereby, we demonstrated the massive presence of M-MDSC in critically ill COVID-19 patients and its association with mortality. Few preliminary data suggest the presence of myeloid-derived suppressor cells and their role in severe COVID-19 and its pathophysiology [28–30]. Bordoni et al. demonstrated that patients with severe COVID-19 admitted in ICU had decreased frequency of lymphocyte T and natural killer, which paralleled expansion of MDSC and high level of cytokines [31]. In complement to our results, Sacchi et al. showed that polymorphonuclear (PMN)-MDSC percentage > 54% was associated with mortality in severe COVID-19, heralding the importance of MDSC in severe COVID-19 [30]. Although accumulation of immature myeloid cells is a recognized severity marker of sepsis since the early 1970s, the role of MDSC in critically ill septic patient's

pathophysiology has been poorly studied [5, 32]. Myeloid-derived suppressor cells are bone marrow heterogeneous myeloid immature precursors that may in certain pathological conditions, such as cancer, sepsis, and autoimmune diseases, partially interrupt their differentiation and expand. Two types of myeloid-derived suppressor cells are identified whether originating from PMN or monocytes precursors. MDSC induces lymphocytes T and natural killer cells apoptosis, inhibits T cells proliferation, induces expansion of T regulatory cells, and produces immunosuppressive cytokines such as IL-10 [33, 34]. Both high proportion of PMN- and M-MDSC were shown to be associated with development of secondary infections and early mortality [35–38]. Waackel et al. in a series of secondary gated M-MDSC-like cells (CD14⁺HLA-DR^{low}, neither CD15 nor CD33 staining) in septic patients, identified a cut-off value of >9% significantly associated with 28-day mortality and occurrence of secondary infections [35]. Altogether, there is convergent data suggesting that MDSC are central in the pathophysiology of sepsis, but its regulation, especially in regard to the temporal and spatial organization, seems to be essential in severe COVID-19 [9, 27].

Our study has several limitations. Inherent to the design, this study remains a preliminary single-center observation in need of further validation. The limited number of patients in the three clusters and their association with outcome warrant further confirmation. Nevertheless, the phenotypic characterization of the three clusters and their reciprocal differences are clear enough to suggest association with specific clinical courses and may be of some utility to select patients for innovative therapy [21, 25, 39].

To conclude, our data suggest that mHLA-DR kinetics allows to identify three myeloid phenotypes in critically ill COVID-19 adult patients potentially associated with specific infective paths: hyperactivated monocyte/macrophage, transient immunodepression, and persistent immunodepression phenotypes.

Abbreviations

COVID-19: Coronavirus disease 2019; mHLA-DR: Monocyte human leukocyte antigen-DR; HAMM: Hyperactivated monocytes/macrophage; PID: Prolonged immunodepression; TID: Transient immunodepression; SARS-CoV-2: Respiratory distress syndrome due to coronavirus 2; CI: Confidence interval; ICU: Intensive care unit; IL-: Interleukin-; TLR: Toll like Receptor; M-/PMN-MDSC: Monocyte-/polymorphonuclear-myeloid-derived suppressor cell; IRB: Institutional board review; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; CD: Cluster of differentiation; NK: Natural killer; IDSA: Infection Disease Society of America; AUROC: Area under the receiver operating characteristics; AB/C: AntiBody per cell; ECMO: Extracorporeal membrane oxygenation.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13613-021-00896-4>.

Additional file 1: Figure S1. Monocyte HLA-DR variation in patients with or without secondary infection. **Table S1.** Circulating cells phenotyping antibodies clones. **Table S2.** Site of secondary infection and associated pathogens.

Acknowledgements

The COVID-19 Immune Suppression (CLOVIS) study group: Simon Barreault, Mélissa Beggaz, Ramy Charbel, Caroline Claude, Zoé Demailly, Philippe Durand, Gaspard Gerschenfeld, Jessica Giraldo, Matteo Guerra, Manon Hily, Martin Journaux, Christopher Lai, Pauline Leroux, Clémence Marais, Zied Merchaoui, Jordi Miatello, Clarisse Niçaise, Jean-Eudes Piloquet, Mélissa Ren, Marie Simbozel, Nada Semaan, Jean-Louis Teboul, Pierre Tissières, Brendan Travert.

Authors' contributions

Design of the work: JM, PT. Acquisition, analysis, or interpretation of data for the work: CM, NS, CC, JM, PT. Drafting the manuscript: CM, JM, PT. Revising it critically for important intellectual content: all authors. All authors approved the final version submitted for publication and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

No funding.

Availability of data and materials

All materials are available upon request to Pr. Pierre Tissières at pierre.tissieres@aphp.fr.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study (French study classification: MR004) was approved by the local IRB and French Data Protection Authority (CNIL Registration number: 2219981) waiving the need of written consent. The study was registered at ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04544878.

Consent for publication

All authors agreed for publication of this study.

Competing interests

Pr. Tissières reports research grants from Merieux Foundation and Chiesi Inc, outside the submitted work, and consulting fee for Baxter, Bristol Myers Squibb, bioMerieux, Faron, Chiesi, Inotrem. All other authors declare that they have no conflict of interest.

Author details

¹Pediatric « Adult COVID-19-Converted » Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP Paris Saclay University, Bicêtre Hospital, 78, Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France. ²Institute of Integrative Biology of the Cell, CNRS, CEA, Univ. Paris Saclay, Gif-sur-Yvette, France. ³Pediatric Intensive Care, Nantes University Hospital, Nantes, France. ⁴Medical Intensive Care, AP-HP Paris Saclay University, Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁵FHU SEP-SIS, AP-HP/Université Paris Saclay/Inserm, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Received: 1 February 2021 Accepted: 29 June 2021

Published online: 14 July 2021

References

- Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2020;81(2):266–75. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046> (Epub 2020 May 27).
- Giacobbe DR, Battaglini D, Ball L, Brunetti I, Bruzzone B, Codda G, Crea F, De Maria A, Dentone C, Di Biagio A, Icardi G, Magnasco L, Marchese A, Mikulska M, Orsi A, Patroniti N, Robba C, Signori A, Taramasso L, Vena A, Pelosi P, Bassetti M. Bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19. *Eur J Clin Invest*. 2020. <https://doi.org/10.1111/eci.13319>.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(12):862–74. <https://doi.org/10.1038/nri3552> (Epub 2013 Nov 15).
- Drewry AM, Ablordeppey EA, Murray ET, Beiter ER, Walton AH, Hall MW, Hotchkiss RS. Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*. 2016;20(1):334. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1505-0>.
- Ost M, Singh A, Peschel A, Mehling P, Rieber N, Hartl D. Myeloid-derived suppressor cells in bacterial infections. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:37. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00037>.
- Venet F, Demaret J, Gossez M, Monneret G. Myeloid cells in sepsis-acquired immunodeficiency. *Ann NY Acad Sci*. 2020. <https://doi.org/10.1111/nyas.14333> (Epub ahead of print).
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Biennu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006;32(8):1175–83. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0204-8> (Epub 2006 Jun 2).
- Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohé J, Vanhems P, Monneret G. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med*. 2010;36(11):1859–66. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-1962-x> (Epub 2010 Jul 23).
- Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet AG, Dubuisson A, Derosa L, Almiere C, Hénon C, Kosmider O, Droin N, Rameau P, Catelain C, Alfaro A, Dussiau C, Friedrich C, Sourdeau E, Marin N, Szwebel TA, Cantin D, Mouton L, Borderie D, Deloger M, Bredel D, Mourad S, Drubay D, Andrieu M, Lhonnéur AS, Saada V, Stoclin A, Willekens C, Pommeret F, Griscelli F, Ng LG, Zhang Z, Bost P, Amit I, Barlesi F, Marabelle A, Pène F, Gachot B, André F, Zitvogel L, Ginhoux F, Fontenay M, Solary E. Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19. *Cell*. 2020;182(6):1401–1418.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.002> (Epub 2020 Aug 5).
- Remy KE, Mazer M, Striker DA, Ellebedy AH, Walton AH, Unsinger J, Blood TM, Mudd PA, Yi DJ, Mannion DA, Osborne DF, Martin RS, Anand NJ, Bosanquet JP, Blood J, Drewry AM, Caldwell CC, Turnbull IR, Brakenridge SC, Moldwauer LL, Hotchkiss RS. Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections. *JCI Insight*. 2020;5(17):e140329. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.140329>.
- Benlyamani I, Venet F, Coudereau R, Gossez M, Monneret G. Monocyte HLA-DR measurement by flow cytometry in COVID-19 patients: an interim review. *Cytometry A*. 2020;97(12):1217–21. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24249>.
- Geslain G, Miatello J, Barreault S, de Melo C, Durand P, Deho A, Naudin J, Zitvogel F, Tissières P, Dauger S, Guilbert AS, Levy M. Paediatric intensive care unit mutation to adult unit during the initial Covid-19 wave: does it make sense? *Minerva Anestesiol*. 2020. <https://doi.org/10.23736/50375-9393.20.14935-6>.
- O'Grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, Lipsitt PA, Masur H, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph AG, Rupp ME, Saint S, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Am J Infect Control*. 2011;39(4 Suppl 1):S1–34. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.01.003>.
- Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, Napolitano LM, O'Grady NP, Bartlett JG, Carratalà J, El Solh AA, Ewig S, Fey PD, File TM Jr, Restrepo MI, Roberts JA, Waterer GW, Cruse P, Knight SL, Brozek JL. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 2016;63(5):e61–e111. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw353> (Epub 2016 Jul 14). Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2017;64(9):1298. Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2017;65(8):1435. Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2017;65(12):2161.
- Hermine O, Mariette X, Tharaux PL, Resche-Rigon M, Porcher R, Ravaud P, CORIMUNO-19 Collaborative Group. Effect of tocilizumab vs usual care in adults hospitalized with COVID-19 and moderate or severe pneumonia: a

- randomized clinical trial. *JAMA Intern Med.* 2020. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6820> (Epub ahead of print).
16. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(4):477–83. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.05.006> (Epub 2013 May 28).
 17. Spinetti T, Hirzel C, Fux M, Walti LN, Schober P, Stueber F, Luedi MM, Scheffold JC. Reduced monocytic human leukocyte antigen-DR expression indicates immunosuppression in critically ill COVID-19 patients. *Anesth Analg.* 2020;131(4):993–9. <https://doi.org/10.1213/ANE.00000000000005044>.
 18. Moratto D, Chiarini M, Giustini V, Serena F, Magro P, Roccaro AM, Imberti L, Castelli F, Notarangelo LD, Quiros-Roldan E. Flow cytometry identifies risk factors and dynamic changes in patients with COVID-19. *J Clin Immunol.* 2020;40(7):970–3. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00806-6> (Epub 2020 Jun 27).
 19. Wang F, Hou H, Yao Y, Wu S, Huang M, Ran X, Zhou H, Liu Z, Sun Z. Systemically comparing host immunity between survived and deceased COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(8):875–7. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0483-y> (Epub 2020 Jun 15).
 20. Carter MJ, Fish M, Jennings A, Doores KJ, Wellman P, Seow J, Acors S, Graham C, Timms E, Kenny J, Neil S, Malim MH, Tibby SM, Shankar-Hari M. Peripheral immunophenotypes in children with multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* 2020;26(11):1701–7. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1054-6> (Epub 2020 Aug 18).
 21. Nguyen LS, Ait Hamou Z, Gastli N, Chapuis N, Pène F. Potential role for interferon gamma in the treatment of recurrent ventilator-acquired pneumonia in patients with COVID-19: a hypothesis. *Intensive Care Med.* 2021;47(5):619–21. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06377-3> (Epub 2021 Mar 10).
 22. Remy S, Gossez M, Belot A, Hayman J, Portefaix A, Venet F, Javouhey E, Monneret G. Massive increase in monocyte HLA-DR expression can be used to discriminate between septic shock and hemophagocytic lymphohistiocytosis-induced shock. *Crit Care.* 2018;22(1):213. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2146-2>.
 23. Prilutskiy A, Kritselis M, Shevtsov A, Yambayev I, Vadlamudi C, Zhao Q, Kataria Y, Sarosiek SR, Lerner A, Sloan JM, Quillen K, Burks EJ. SARS-CoV-2 infection-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Clin Pathol.* 2020;154(4):466–74. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa124>.
 24. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, Damoraki G, Gkavogianni T, Adami ME, Katsaounou P, Ntanganou M, Kyriakopoulou M, Dimopoulos G, Koutsodimitropoulos I, Velissaris D, Koufargyris P, Karageorgos A, Katrini K, Lekakis V, Lupse M, Kotsaki A, Renieris G, Theodorou D, Panou V, Koukaki E, Koulouris N, Gogos C, Koutsoukou A. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe.* 2020;27(6):992–1000.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.009> (Epub 2020 Apr 21).
 25. Dimopoulos G, de Mast Q, Markou N, Theodorakopoulou M, Komnos A, Mouktaroudi M, Netea MG, Spyridopoulos T, Verheggen RJ, Hoogerwerf J, Lachana A, van de Veerdonk FL, Giamarellos-Bourboulis EJ. Favorable anakinra responses in severe Covid-19 patients with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Cell Host Microbe.* 2020;28(1):117–123.e1. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.007> (Epub 2020 May 14).
 26. Gatti A, Radrizzani D, Viganò P, Mazzone A, Brando B. Decrease of non-classical and intermediate monocyte subsets in severe acute SARS-CoV-2 infection. *Cytometry A.* 2020;97(9):887–90. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24188> (Epub 2020 Aug 14).
 27. Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, Perera RAPM, Scott M, Hagan T, Sigal N, Feng Y, Bristow L, Tak-Yin Tsang O, Wagh D, Collier J, Pellegrini KL, Kazmin D, Alaaeddine G, Leung WS, Chan JMC, Chik TSH, Choi CYC, Huerta C, Paine McCullough M, Lv H, Anderson E, Edupuganti S, Upadhyay AA, Bosinger SE, Maecker HT, Khatri P, Roupael N, Peiris M, Pulendran B. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science.* 2020;369(6508):1210–20. <https://doi.org/10.1126/science.abc6261> (Epub 2020 Aug 11).
 28. Reyes M, Filbin MR, Bhattacharyya RP, Sonny A, Mehta A, Billman K, Kays KR, Pinilla-Vera M, Benson ME, Cosimi LA, Hung DT, Levy BD, Villani AC, Sade-Feldman M, Baron RM, Goldberg MB, Blainey PC, Hacohen N. Induction of a regulatory myeloid program in bacterial sepsis and severe COVID-19. *bioRxiv.* 2020:2020.09.02.280180. <https://doi.org/10.1101/2020.09.02.280180> (Preprint).
 29. Thompson E, Cascino K, Ordóñez A, Zhou W, Vaghiasa A, Hamacher-Brady A, Brady N, Sun IH, Wang R, Rosenberg A, Delaney M, Rothman RE, Fenstermacher K, Sauer L, Shaw-Saliba K, Bloch EM, Redd A, Tobian AA, Horton M, Smith K, Pekosz A, D'Alessio F, Yegnasubramanian S, Ji H, Cox AL, Powell JD. Mitochondrial induced T cell apoptosis and aberrant myeloid metabolic programs define distinct immune cell subsets during acute and recovered SARS-CoV-2 infection. *medRxiv.* 2020:2020.09.10.20186064. <https://doi.org/10.1101/2020.09.10.20186064> (Preprint).
 30. Sacchi A, Grassi G, Bordoni V, Lorenzini P, Cimini E, Casetti R, Tartaglia E, Marchioni L, Petrosillo N, Palmieri F, D'Offizi G, Notari S, Tempestilli M, Capobianchi MR, Nicastrì E, Maeurer M, Zumla A, Locatelli F, Antinori A, Ippolito G, Agrati C. Early expansion of myeloid-derived suppressor cells inhibits SARS-CoV-2 specific T-cell response and may predict fatal COVID-19 outcome. *Cell Death Dis.* 2020;11(10):921. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03125-1>.
 31. Bordoni V, Sacchi A, Cimini E, Notari S, Grassi G, Tartaglia E, Casetti R, Giancola L, Bevilacqua N, Maeurer M, Zumla A, Locatelli F, De Benedetti F, Palmieri F, Marchioni L, Capobianchi MR, D'Offizi G, Petrosillo N, Antinori A, Nicastrì E, Ippolito G, Agrati C. An inflammatory profile correlates with decreased frequency of cytotoxic cells in COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa577> (Epub ahead of print).
 32. Schrijver IT, Théroude C, Roger T. Myeloid-derived suppressor cells in sepsis. *Front Immunol.* 2019;10:327. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00327>.
 33. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodriguez PC, Sica A, Umansky V, Vonderheide RH, Gabrilovich DI. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016;7:12150. <https://doi.org/10.1038/ncomms12150>.
 34. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162–74. <https://doi.org/10.1038/nri2506>.
 35. Waeckel L, Venet F, Gossez M, Monard C, Rimmelé T, Monneret G. Delayed persistence of elevated monocytic MDSC associates with deleterious outcomes in septic shock: a retrospective cohort study. *Crit Care.* 2020;24(1):132. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02857-y>.
 36. Uhel F, Azzaoui I, Grégoire M, Pangault C, Dulong J, Tadié JM, Gacouin A, Camus C, Cynober L, Fest T, Le Tulzo Y, Roussel M, Tarte K. Early expansion of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells predicts development of nosocomial infections in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(3):315–27. <https://doi.org/10.1164/rccm.201606-1143OC>.
 37. Mathias B, Delmas AL, Ozrazgat-Baslanti T, Vanzant EL, Szpila BE, Mohr AM, Moore FA, Brakenridge SC, Brumback BA, Moldawer LL, Efron PA, the Sepsis, Critical Illness Research Center Investigators. Human myeloid-derived suppressor cells are associated with chronic immune suppression after severe sepsis/septic shock. *Ann Surg.* 2017;265(4):827–34. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001783>.
 38. Janols H, Bergenfelz C, Allaoui R, Larsson AM, Rydén L, Björnsson S, Janciauskiene S, Wullt M, Bredberg A, Leanderson K. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol.* 2014;96(5):685–93. <https://doi.org/10.1189/jlb.5HI0214-074R> (Epub 2014 Jun 13).
 39. Coopersmith CM, Antonelli M, Bauer SR, Deutschman CS, Evans LE, Ferrer R, Hellman J, Jog S, Kesecioglu J, Kisson N, Martin-Loeches I, Nunnally ME, Prescott HC, Rhodes A, Talmor D, Tissieres P, De Backer D. Surviving sepsis campaign: research priorities for COVID-19 in critical illness. *Crit Care Med.* 2021;49(4):598–622. <https://doi.org/10.1097/CCM.00000000000004895>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3 Le projet SEPTIFOIE : un protocole pour l'étude des biomarqueurs des infections associées aux soins et de l'immunodépression chez l'enfant après transplantation hépatique

3.1 Contexte

La transplantation hépatique est devenue, au cours des dernières décennies, la thérapie de référence pour les maladies hépatiques pédiatriques en phase terminale. La période post-transplantation est toujours associée à de fréquentes complications infectieuses et immunologiques, qui représentent 40 à 60 % de tous les cas. Le foie est un élément clé de la signalisation immuno-inflammatoire et de la réponse de l'hôte aux pathogènes par la production de composés sériques tels que les protéines de phase aiguë, les compléments, les peptides antimicrobiens. La période qui suit la transplantation est donc étroitement associée à la récupération de la fonction hépatique et à la restauration de l'immunocompétence. En tant que telle, elle correspond à une période de fragilité immunologique où peuvent survenir à la fois des complications septiques et un rejet aigu.

3.2 Description de l'étude

L'objectif de cette étude est de mieux caractériser le profil fonctionnel immuno-inflammatoire après une transplantation hépatique chez l'enfant et de définir son association avec la survenue de complications infectieuses et immunologiques. Un suivi longitudinal prospectif monocentrique de 60 enfants transplantés hépatiques à l'AP-HP. Université Paris Saclay, Hôpital Bicêtre sera réalisé. Avant la transplantation et aux jours 3, 7 et 14, tous les enfants auront une caractérisation immunologique approfondie. Cela comprendra l'analyse :

- les phénotypes des leucocytes circulants (mHLA-DR, sous-populations de monocytes incluant M-MDSC, activation des neutrophiles et récepteurs Fc, sous-populations de cellules T)

- le profil transcriptionnel des leucocytes (gènes candidats : CD74, CX3CR1, S100A8/A9/A12, TLRs),
- la cinétique des cytokines et des protéines sériques (C3, C4, PCT, IL-6, IL-8, IL12p70, IL-1, TNF, IL-10, IP-10),
- des test d'opsonophagocytose *ex vivo*,
- des test de cytotoxicité plasmatique *ex vivo*.

Les profils immunologiques seront analysés globalement et stratifiés en fonction du développement des complications infectieuses et immunologiques. Un accord éthique a été obtenu auprès du Comité de Protection des Personnes (CPP Ile-de-France VII) le 15 octobre 2014 (numéro de référence PP14-031), l'étude déclarée à la Commission Nationale de l'Information et des Libertés (numéro de déclaration CNIL : 1787808v0), et le biobanking déclaré à l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (numéro de référence ANSM 2014-A01048-39, le 24/06/2014) selon la réglementation française. Les résultats seront diffusés par des présentations internationales lors de réunions scientifiques et des publications dans des revues à comité de lecture. Numéro d'enregistrement de Clinicaltrial.gov : NCT04302246.

3.3 Résultats et conclusion

A ce jour, l'ensemble des inclusions ont eu lieu, soit un total de 61 patients. Les prélèvements biologiques ont été collectés et les expériences nécessitant d'être réalisées sur cellules fraîches ont été effectuées (cytométrie en flux pour marquage des protéines de la surface cellulaire, test de phagocytose). L'ensemble des autres expériences sont en cours de réalisation. Les données cliniques et paracliniques ont été collectées et saisies dans l'eCRF. Des analyses ciblées sur certains marqueurs sont en cours (mHLA-DR par exemple). Les résultats ne sont pas encore disponibles.

Le manuscrit ci-dessous a été soumis dans la section « protocoles » de la revue BMJ open.

BMJ Open

The SEPTIFOIE project: a protocol for studying biomarkers of health associated infections and immunodepression of children after liver transplantation

Journal:	<i>BMJ Open</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Protocol
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Miatello, Jordi; Assistance Publique - Hopitaux de Paris; Paris-Saclay University Marais, Clémence; Assistance Publique - Hopitaux de Paris; Paris-Saclay University Claude, Caroline; Assistance Publique - Hopitaux de Paris; Paris-Saclay University Vandewynckele, Nada; Assistance Publique - Hopitaux de Paris; Paris-Saclay University Bouarour, Smail; Assistance Publique - Hopitaux de Paris Agostini, Helene; Assistance Publique - Hopitaux de Paris TISSIERES, Pierre; Assistance Publique - Hopitaux de Paris; Paris-Saclay University
Keywords:	IMMUNOLOGY, Paediatric intensive & critical care < INTENSIVE & CRITICAL CARE, Paediatric hepatology < PAEDIATRICS

SCHOLARONE™
Manuscripts

Reporting checklist for protocol of a clinical trial.

Based on the SPIRIT guidelines.

Instructions to authors

Complete this checklist by entering the page numbers from your manuscript where readers will find each of the items listed below.

Your article may not currently address all the items on the checklist. Please modify your text to include the missing information. If you are certain that an item does not apply, please write "n/a" and provide a short explanation.

Upload your completed checklist as an extra file when you submit to a journal.

In your methods section, say that you used the SPIRITreporting guidelines, and cite them as:

Chan A-W, Tetzlaff JM, Gøtzsche PC, Altman DG, Mann H, Berlin J, Dickersin K, Hróbjartsson A, Schulz KF, Parulekar WR, Krleža-Jerić K, Laupacis A, Moher D. SPIRIT 2013 Explanation and Elaboration: Guidance for protocols of clinical trials. *BMJ*. 2013;346:e7586

		Reporting Item	Page Number
Administrative information			
Title	#1	Descriptive title identifying the study design, population, interventions, and, if applicable, trial acronym	1
Trial registration	#2a	Trial identifier and registry name. If not yet registered, name of intended registry	3
Trial registration: data set	#2b	All items from the World Health Organization Trial Registration Data Set	28
Protocol version	#3	Date and version identifier	n/a
Funding	#4	Sources and types of financial, material, and other support	22
Roles and responsibilities: contributorship	#5a	Names, affiliations, and roles of protocol contributors	22

For peer review only - <http://bmjopen.bmj.com/site/about/guidelines.xhtml>

1	Roles and	#5b	Name and contact information for the trial sponsor	22
2	responsibilities:			
3	sponsor contact			
4	information			
5				
6				
7				
8	Roles and	#5c	Role of study sponsor and funders, if any, in study design;	n/a
9	responsibilities:		collection, management, analysis, and interpretation of data;	
10	sponsor and funder		writing of the report; and the decision to submit the report for	
11			publication, including whether they will have ultimate authority	
12			over any of these activities	
13				
14				
15				
16	Roles and	#5d	Composition, roles, and responsibilities of the coordinating centre,	n/a
17	responsibilities:		steering committee, endpoint adjudication committee, data	
18	committees		management team, and other individuals or groups overseeing the	
19			trial, if applicable (see Item 21a for data monitoring committee)	
20				
21				
22				
23	Introduction			
24				
25	Background and	#6a	Description of research question and justification for undertaking	4
26	rationale		the trial, including summary of relevant studies (published and	
27			unpublished) examining benefits and harms for each intervention	
28				
29				
30				
31	Background and	#6b	Explanation for choice of comparators	n/a
32	rationale: choice of			
33	comparators			
34				
35				
36	Objectives	#7	Specific objectives or hypotheses	12
37				
38	Trial design	#8	Description of trial design including type of trial (eg, parallel	13
39			group, crossover, factorial, single group), allocation ratio, and	
40			framework (eg, superiority, equivalence, non-inferiority,	
41			exploratory)	
42				
43				
44				
45	Methods:			
46	Participants,			
47	interventions, and			
48	outcomes			
49				
50				
51				
52	Study setting	#9	Description of study settings (eg, community clinic, academic	13
53			hospital) and list of countries where data will be collected.	
54			Reference to where list of study sites can be obtained	
55				
56				
57	Eligibility criteria	#10	Inclusion and exclusion criteria for participants. If applicable,	13
58			eligibility criteria for study centres and individuals who will	
59				
60				

For peer review only - <http://bmjopen.bmj.com/site/about/guidelines.xhtml>

1		perform the interventions (eg, surgeons, psychotherapists)	
2			
3	Interventions:	#11a Interventions for each group with sufficient detail to allow	n/a
4	description	replication, including how and when they will be administered	
5			
6	Interventions:	#11b Criteria for discontinuing or modifying allocated interventions for a	n/a
7	modifications	given trial participant (eg, drug dose change in response to harms,	
8		participant request, or improving / worsening disease)	
9			
10			
11	Interventions:	#11c Strategies to improve adherence to intervention protocols, and any	n/a
12	adherence	procedures for monitoring adherence (eg, drug tablet return;	
13		laboratory tests)	
14			
15			
16			
17	Interventions:	#11d Relevant concomitant care and interventions that are permitted or	n/a
18	concomitant care	prohibited during the trial	
19			
20			
21	Outcomes	#12 Primary, secondary, and other outcomes, including the specific	12
22		measurement variable (eg, systolic blood pressure), analysis metric	
23		(eg, change from baseline, final value, time to event), method of	
24		aggregation (eg, median, proportion), and time point for each	
25		outcome. Explanation of the clinical relevance of chosen efficacy	
26		and harm outcomes is strongly recommended	
27			
28			
29			
30			
31	Participant timeline	#13 Time schedule of enrolment, interventions (including any run-ins	27
32		and washouts), assessments, and visits for participants. A	
33		schematic diagram is highly recommended (see Figure)	
34			
35			
36	Sample size	#14 Estimated number of participants needed to achieve study	16
37		objectives and how it was determined, including clinical and	
38		statistical assumptions supporting any sample size calculations	
39			
40			
41	Recruitment	#15 Strategies for achieving adequate participant enrolment to reach	16
42		target sample size	
43			
44			
45	Methods: Assignment		
46	of interventions (for		
47	controlled trials)		
48			
49			
50	Allocation: sequence	#16a Method of generating the allocation sequence (eg, computer-	n/a
51	generation	generated random numbers), and list of any factors for	
52		stratification. To reduce predictability of a random sequence,	
53		details of any planned restriction (eg, blocking) should be provided	
54		in a separate document that is unavailable to those who enrol	
55		participants or assign interventions	
56			
57			
58			
59			
60			

1	Allocation concealment	#16b	Mechanism of implementing the allocation sequence (eg, central telephone; sequentially numbered, opaque, sealed envelopes), describing any steps to conceal the sequence until interventions are assigned	n/a
2				
3	mechanism			
4				
5				
6				
7				
8	Allocation:	#16c	Who will generate the allocation sequence, who will enrol participants, and who will assign participants to interventions	n/a
9	implementation			
10				
11	Blinding (masking)	#17a	Who will be blinded after assignment to interventions (eg, trial participants, care providers, outcome assessors, data analysts), and how	n/a
12				
13				
14				
15				
16				
17	Blinding (masking):	#17b	If blinded, circumstances under which unblinding is permissible, and procedure for revealing a participant's allocated intervention during the trial	n/a
18	emergency unblinding			
19				
20				
21				
22	Methods: Data			
23	collection,			
24	management, and			
25	analysis			
26				
27				
28				
29	Data collection plan	#18a	Plans for assessment and collection of outcome, baseline, and other trial data, including any related processes to promote data quality (eg, duplicate measurements, training of assessors) and a description of study instruments (eg, questionnaires, laboratory tests) along with their reliability and validity, if known. Reference to where data collection forms can be found, if not in the protocol	14
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39	Data collection plan:	#18b	Plans to promote participant retention and complete follow-up, including list of any outcome data to be collected for participants who discontinue or deviate from intervention protocols	14
40	retention			
41				
42				
43				
44	Data management	#19	Plans for data entry, coding, security, and storage, including any related processes to promote data quality (eg, double data entry; range checks for data values). Reference to where details of data management procedures can be found, if not in the protocol	14
45				
46				
47				
48				
49				
50				
51	Statistics: outcomes	#20a	Statistical methods for analysing primary and secondary outcomes. Reference to where other details of the statistical analysis plan can be found, if not in the protocol	16
52				
53				
54				
55				
56	Statistics: additional	#20b	Methods for any additional analyses (eg, subgroup and adjusted analyses)	n/a
57	analyses			
58				
59				
60				

For peer review only - <http://bmjopen.bmj.com/site/about/guidelines.xhtml>

1	Statistics: analysis	#20c	Definition of analysis population relating to protocol non-	16
2	population and missing		adherence (eg, as randomised analysis), and any statistical methods	
3	data		to handle missing data (eg, multiple imputation)	
4				
5				
6	Methods: Monitoring			
7				
8				
9	Data monitoring:	#21a	Composition of data monitoring committee (DMC); summary of its	n/a
10	formal committee		role and reporting structure; statement of whether it is independent	
11			from the sponsor and competing interests; and reference to where	
12			further details about its charter can be found, if not in the protocol.	
13			Alternatively, an explanation of why a DMC is not needed	
14				
15				
16				
17	Data monitoring:	#21b	Description of any interim analyses and stopping guidelines,	n/a
18	interim analysis		including who will have access to these interim results and make	
19			the final decision to terminate the trial	
20				
21				
22	Harms	#22	Plans for collecting, assessing, reporting, and managing solicited	14
23			and spontaneously reported adverse events and other unintended	
24			effects of trial interventions or trial conduct	
25				
26				
27				
28	Auditing	#23	Frequency and procedures for auditing trial conduct, if any, and	n/a
29			whether the process will be independent from investigators and the	
30			sponsor	
31				
32				
33	Ethics and			
34	dissemination			
35				
36				
37	Research ethics	#24	Plans for seeking research ethics committee / institutional review	19
38	approval		board (REC / IRB) approval	
39				
40				
41	Protocol amendments	#25	Plans for communicating important protocol modifications (eg,	n/a
42			changes to eligibility criteria, outcomes, analyses) to relevant	
43			parties (eg, investigators, REC / IRBs, trial participants, trial	
44			registries, journals, regulators)	
45				
46				
47	Consent or assent	#26a	Who will obtain informed consent or assent from potential trial	19
48			participants or authorised surrogates, and how (see Item 32)	
49				
50				
51	Consent or assent:	#26b	Additional consent provisions for collection and use of participant	n/a
52	ancillary studies		data and biological specimens in ancillary studies, if applicable	
53				
54				
55	Confidentiality	#27	How personal information about potential and enrolled participants	20
56			will be collected, shared, and maintained in order to protect	
57			confidentiality before, during, and after the trial	
58				
59				
60				

For peer review only - <http://bmjopen.bmj.com/site/about/guidelines.xhtml>

1	Declaration of interests	#28	Financial and other competing interests for principal investigators for the overall trial and each study site	22
2				
3				
4				
5	Data access	#29	Statement of who will have access to the final trial dataset, and disclosure of contractual agreements that limit such access for investigators	n/a
6				
7				
8				
9				
10	Ancillary and post trial care	#30	Provisions, if any, for ancillary and post-trial care, and for compensation to those who suffer harm from trial participation	n/a
11				
12				
13				
14	Dissemination policy: trial results	#31a	Plans for investigators and sponsor to communicate trial results to participants, healthcare professionals, the public, and other relevant groups (eg, via publication, reporting in results databases, or other data sharing arrangements), including any publication restrictions	n/a
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21	Dissemination policy: authorship	#31b	Authorship eligibility guidelines and any intended use of professional writers	22
22				
23				
24				
25	Dissemination policy: reproducible research	#31c	Plans, if any, for granting public access to the full protocol, participant-level dataset, and statistical code	n/a
26				
27				
28				
29	Appendices			
30				
31	Informed consent materials	#32	Model consent form and other related documentation given to participants and authorised surrogates	n/a
32				
33				
34				
35	Biological specimens	#33	Plans for collection, laboratory evaluation, and storage of biological specimens for genetic or molecular analysis in the current trial and for future use in ancillary studies, if applicable	n/a
36				
37				
38				
39				

The SPIRIT Explanation and Elaboration paper is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC-BY-NC. This checklist was completed on 26. October 2022 using <https://www.goodreports.org/>, a tool made by the [EQUATOR Network](#) in collaboration with [Penelope.ai](#)

40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **The SEPTIFOIE project: a protocol for studying biomarkers of health associated**
4
5 **infections and immunodepression of children after liver transplantation**
6
7

8
9
10 Jordi Miatello^{1,2,3}, Clémence Marais^{1,2,3}, Caroline Claude^{1,2,3}, Nada^{1,2,3}, Smail Bouarour⁴,
11
12 Helene Agostini⁴ and Pierre Tissieres^{1,2,3}, on behalf of the SEPTIFOIE study group.
13
14

15
16
17 **Author affiliations**
18

- 19
20 1. Paediatric Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP Paris Saclay University,
21
22 Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France.
23
24 2. Institute of Integrative Biology of the Cell, CNRS, CEA, Paris Saclay University, Gif-
25
26 sur-Yvette, France.
27
28 3. FHU Sepsis, Inserm/AP-HP/Université Paris Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France.
29
30 4. Clinical Research Unit, AP-HP Paris Saclay University, Bicêtre Hospital, Le Kremlin-
31
32 Bicêtre, France.
33
34
35
36

37
38 **Correspondence to** Pr Pierre Tissières, MD, DSc, pierre.tissieres@aphp.fr
39
40

41
42 **Key words:** liver transplantation, sepsis, immunosuppression, children, diagnosis, liver
43
44 failure
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Introduction

Liver transplantation has become, within the last decades, the reference therapy for end stage paediatric liver diseases. The liver is a key component of immune-inflammatory signalling and host response to pathogens through production of serum proteins and peptides such acute phase proteins, complements, antimicrobial peptides. The period following transplantation is therefore closely associated with liver function recovery and immunocompetency restoration. As such, this corresponds to a period of immunological fragility where both septic complications and acute rejection can occur. The purpose of this study is to better characterize the functional immune-inflammatory profile following liver transplantation in children and define its association with occurrence of infective and immunologic complications.

Methods and analysis

A single centre prospective longitudinal follow-up of 60 children undergoing liver transplantation at the AP-HP Paris Saclay University will be performed. Before transplantation and at day 3, 7 and 14 days after, all children will have extensive immunological characterization. This will include analysis of 1) circulating leukocytes phenotypes (monocytes HLA-DR, monocytes subpopulations, neutrophils activation and Fcγ receptors, T cells subpopulations), 2) Leukocytes transcriptome kinetic 3) Cytokines and serum proteins kinetics 4) *In-vitro* phagocytosis assay, 5) *Ex-vivo* opsonophagocytosis assay, 6) *Ex-vivo* plasma cytotoxicity assay. Immunological profiles will be globally analysed and stratified according to the development of infective and immunological complications.

Ethics and dissemination

Ethical approval has been obtained from the Comité de Protection des Personnes (CPP Ile-de-France VII) on October 15, 2014 (reference number PP14-031), the study declared to the Commission Nationale de l'Information et des Libertés (CNIL declaration number: 1787808v0), and the biobanking declared to the Agence Nationale de Sécurité du Médicament

1
2
3 (ANSM reference number 2014-A01048-39, on 24/06/2014) according to French regulation.
4

5 Results will be disseminated through international presentations at scientific meetings and
6
7 publications in peer-reviewed journals.
8

9
10 **Trial registration number**
11

12 Clinicaltrial.gov registration number: NCT04302246
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Strengths and limitations of this study

- This prospective single centre study aims to characterise immunophenotypic signature of secondary infection in children after liver transplantation.
- The identified biomarkers through this study could provide new diagnostic and prognostic tools to identify children at risk of developing post-operative infective complications.
- Kinetics of transcriptomic and immunological phenotypes, anti-infective functional assay will bring new insight in the understanding of immune recovery following liver transplantation.
- The single centre design and local management may limit extrapolation and warrant confirmatory study.

INTRODUCTION

Bacterial infections are particularly prevalent during the first 10 days after transplantation, half being surgical site infections [1,2]. Gram-negative bacillus account for 57% of identified pathogens with a significant amount displaying antimicrobial multi-resistant profile. Viral infections are rare during the first two postoperative weeks with herpes viridae family (incl. HSV, CMV, EBV, HHV6, HHV8) and adenovirus being the most prevalent. Those viral infections are frequently associated with immunological complications such as graft rejection, hepatitis/graft necrosis, and the development of lymphoproliferative syndrome. Thus, patients are at high risk of developing immune-infective complications such as sepsis and graft rejection following liver transplantation. Importance of differentiating both conditions is related to the necessity to initiate rapid targeted therapeutic intervention as delay may strongly impair patient prognosis [3].

This period of immunological fragility occurs in a context where proteins essential for the host immune response (acute phase protein, opsonins, complement proteins, etc.) are deficient as a result of a *de novo*, but transient, dysfunction of hepatic synthetic functions. Beside the specific immune consequence related to the restoration of immunity in the post transplantation period, most patients have pre-operative liver failure either due to end-stage cirrhosis or acute liver failure. Both conditions are well associated with infective complications such spontaneous bacterial peritonitis due to Gram-negative bacteria in end-stage cirrhosis [4–6]. Importantly those complications are associated with increased mortality in children [6,7]. It is though that both innate immune and adaptive response is altered in patients with end-stage liver disease. Per-operatively, damage occurs to the graft engaging an immune response. The first tissue damage to the graft occurs at harvest, the most obvious example being ischaemic-reperfusion injury. The innate immune system intervenes first and

1
2
3 triggers a non-specific inflammatory response, independent of the recognition of foreign
4
5 tissue antigens. Macrophages, neutrophils and natural killer (NK) cells are activated by
6
7 recognising Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), resulting in the production of
8
9 pro-inflammatory cytokines (interleukin (IL)-1, IL-6, tumour necrosis factor, interferons) and
10
11 chemokines. The innate immune system activation triggers the complement cascade, which
12
13 creates tissue damage independently of alloantibody binding and is able to activate NK cells.
14
15 In addition, p-selectin, an important adhesion molecule, is upregulated on endothelial cells
16
17 and mediates the characteristic ischaemic-reperfusion vascular injury that alters the
18
19 permeability and integrity of the endothelium. This in turn exacerbates the tissue injury and
20
21 triggers the systemic host response to the graft, promoting the engagement of the adaptive
22
23 immune system. The post-operative period that is associated with induction of
24
25 immunosuppressive therapy in order to counteract acute graft rejection further impact patient
26
27 immunity. In transplantation, this response is initially directed predominantly by T cells that
28
29 react to the disparity in major histocompatibility complex (MHC) molecules, HLA in humans,
30
31 between the donor and recipient. In the normal liver, class I antigens (MHC I: HLA A, B, C)
32
33 are widely expressed on all cell types, while class II antigens (MHC II: HLA DP, DQ, DR)
34
35 are expressed mainly on antigen-presenting cells (APCs) and Kupffer cells. In rejection,
36
37 expression of class I and II is induced preferentially on endothelial cells and biliary
38
39 epithelium. Antibodies to class II antigens bind complement more avidly than those to class I.
40
41 Although MHC molecules are one of the most important targets, non-MHC targets, such as
42
43 the angiotensin II-1 receptor (AT1R), are increasingly recognised as important [8]. The
44
45 importance of the T cell response is reinforced by the breadth of the T cell precursor
46
47 repertoire. Two interactions between recipient T cells and their target antigens have been
48
49 described: direct allorecognition when the T cell receptor binds to intact MHC complexes
50
51 presented by donor APCs; and indirect allorecognition when the T cell binds to a donor-
52
53 derived peptide presented on APCs. Donor APCs are a relatively small and limited population
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 that can be rapidly depleted, whereas the recipient APC population is renewable and capable
4
5 of maintaining a sustained long-term response. After the foreign antigen recognition step,
6
7 recipient T cells are activated through the CD3 receptor via costimulatory pathways. CD28,
8
9 constitutively expressed on T cells, is an important up-regulator through its binding to B7
10
11 family members (CD80 and CD86), which induce IL-2 expression. Conversely, CD152
12
13 (CTLA-4), also expressed on activated T cells, competes with the binding of CD28 to its
14
15 ligands, and is therefore an important downregulator of the activation process. The other
16
17 important co-stimulatory pathway is the tumour necrosis factor (TNF) receptor family,
18
19 characterised by the interaction between CD40 and the CD40 ligand (CD154).
20
21
22 Intracellular signalling pathways are the final step in the cell activation sequence. Briefly,
23
24 phosphorylation of several different signalling molecules in the cytoplasm generates
25
26 transcription factors that carry the activation message to the nucleus, initiating the
27
28 transcription of many genes. Two of the most important pathways upregulate IL-2 and the IL-
29
30 2 high affinity receptor. IL-2 is an essential growth factor, which promotes T cell cycle
31
32 progression and clonal expansion. The central mechanism of tacrolimus and cyclosporine is
33
34 the inhibition of calcineurin, an important intracellular activating messenger that inhibits IL-2
35
36 production. B cells also play an important role in the immune response through the synthesis
37
38 of potentially destructive antibodies. In addition, B cells are capable of expressing
39
40 complement receptors and can function as an APC. B cell activation is usually dependent on
41
42 T cell assistance and is therefore linked to complex T cell differentiation pathways. Antibody-
43
44 mediated injury is most often due to the cytotoxic effect of the complement-binding antibody.
45
46 Destructive antibodies associated with graft injury can be generated against mismatched HLA
47
48 molecules, as well as non-HLA targets, such as blood group antigens, the endothelin type A
49
50 receptor and MHC class I chain-linked molecule A [9]. Autoantibodies directed against
51
52 antigens expressed on the endothelium, such as AT-1R (Angiotensin II type-1 receptor) [10],
53
54 can induce severe local injury characterised by microvascular coagulation and complement
55
56
57
58
59
60

7

1
2
3 activation causing multiple thromboses within the graft. Two other important concepts in graft
4 injury are the dynamics of cell trafficking and the upregulation of adhesion molecules.

5
6
7 Chemokines synthesised by activated leukocytes play a key role in recruiting activated cells to
8 secondary lymphoid tissues and back to the graft. Adhesion molecules attach leukocytes to
9
10 the endothelium, allowing their extravasation to the graft. Cytotoxic T cells, once bound to
11
12 their target cell, release perforin molecules, creating pores in the target cell membrane through
13
14 which the T cell granzyme B protease enters the cell and triggers apoptosis of the cell
15
16
17 (programmed cell death).
18

19
20
21
22 The liver has long been considered immunologically privileged and clinicians have found that
23
24 liver transplant recipients appear to require less immunosuppression, have less rejection, a
25
26 lower risk of lasting graft damage or graft loss through rejection, and a reduced incidence of
27
28 chronic rejection compared to recipients of other organs. The first reports of successful
29
30 weaning from all immunosuppression were made in liver transplant recipients [11,12] and
31
32 other reports showed that immunosuppression could be stopped indefinitely in some children
33
34 treated for post-transplant lymphoproliferative disease [13]. Several hypotheses have been put
35
36 forward to explain the tolerogenic effect of the liver [13,14]. Two important anatomical
37
38 features are likely to play a role: the unique structure and large surface area of the sinusoidal
39
40 microvascular bed, and the portal vein circulation that carries a multitude of oral antigens and
41
42 endotoxins into the liver. The liver has evolved to tolerate this antigen load through a number
43
44 of specialised APCs [15], including dendritic cells, Kupffer cells, hepatic stellate cells and
45
46 sinusoidal endothelial cells [15]. These APCs are thought to present antigens to T cells in a
47
48 manner that induces T cell apoptosis, anergy or differentiation into regulatory T cells. Other
49
50 properties of the liver that may confer immune protection in transplantation are the secretion
51
52 of high levels of soluble HLA antigens and the ability of Kupffer cells to phagocytose
53
54 immune complexes, platelet aggregates and activated complement complexes. The final, and
55
56 perhaps most important, hypothesis is that the liver itself has regenerative properties.
57
58
59
60

1
2
3 Intrinsically septic complications and rejection are closely related through common and
4
5 complementary immune paths and complex networks of cellular effectors and inflammatory
6
7 mediators. Taking into account the complexity of these clinical syndromes and the difficulty
8
9 of rapid differential diagnosis, the availability of early biological markers (biomarkers) of
10
11 immuno-infectious complications would help the clinician to target therapeutic management
12
13 and to preserve the graft from secondary alterations related to host immune conflict against
14
15 the pathogen or graft antigens. The integration of biomarkers into clinical practice would
16
17 allow: i) identify patients at risk of complications and consider prophylaxis, ii) to adapt the
18
19 intensity of the treatment implemented, iii) target candidate populations for a particular
20
21 innovative therapy, and iii) measure response to specific treatment [16]. The notion of
22
23 biomarker includes objectively measured and evaluated biological characteristics as an
24
25 indicator of a normal or pathological biological process, or a pharmacological response to a
26
27 therapy [17]. Thus, a biomarker can be a protein, genomic or functional profile. The literature
28
29 reports numerous candidate markers for the diagnosis of sepsis or the prediction of its
30
31 prognosis, in particular to assist in the prescription of innovative therapies. On the other hand,
32
33 the search for biomarkers of graft tolerance is a major subject for the adaptation of
34
35 immunosuppressive therapies.
36
37
38
39
40

41
42 Numerous plasma and cellular biomarkers have been tested for prediction of prognosis in
43
44 sepsis or septic characterisation of an inflammatory syndrome. The severity of sepsis and its
45
46 prognosis have been consistently associated with higher plasma IL-10, IL-6 and cortisol levels
47
48 [18,19], or associated with decreased monocyte HLA-DR [20,21]. Other molecules of the
49
50 DAMPs family such as HMGB1 [16] or S100A8/A9 [21] are being investigated for
51
52 prognostic prediction. Plasma procalcitonin levels may vary with response to anti-infective
53
54 therapy [22]. However, none of these markers have achieved the necessary validation as tools
55
56 in clinical practice. In recent years, clinical investigations have been conducted to identify a
57
58 transcriptomic signature associated with the course of sepsis. A seminal work by Calvano et
59
60

1
2
3 al. described that the transcriptomic response to endotoxemia in healthy volunteers [23]
4
5 involved an inflammatory and metabolic response, and revealed an early increase in
6
7 cytokine/chemokine transcription factors, a late increase in regulatory molecules, a decrease
8
9 in the major histocompatibility complex, an overexpression of the NADPH oxidase system, a
10
11 decrease in adhesion molecules and a decrease in the expression of mitochondrial complexes.
12
13 Since then numerous transcriptomic signatures were associated with sepsis outlining three
14
15 main questions of interest:
16
17

- 18 1) the septic nature of an inflammatory syndrome [24,25],
 - 19 2) the prognosis of sepsis [26,27],
 - 20 3) the pathophysiology or recovery of sepsis [28].
- 21
22
23
24
25
26
27

28 In contrast to specific plasma and genomic biomarkers, the study of functional responses
29
30 makes it possible to integrate all the molecular mechanisms relating to a biological function.
31
32 In our case, the characterisation of the host's innate immune response capacities to an
33
34 infection will allow us to better understand the kinetics of post-operative immuno-infectious
35
36 complications.
37
38
39
40
41

42 **RATIONALE OF THE STUDY**

43

44 From a clinical perspective, elevated incidence of sepsis in the early post-operative period
45
46 following LT, and more specifically to Gram negative bacteria has been repetitively observed
47
48 [1,2]. Those infections are closely associated with prognosis with a significant association
49
50 with 28 days mortality [2]. So far, no systematic analysis of proteic, transcriptomic and
51
52 functional biomarkers of sepsis in this population has been performed. The
53
54 delayed/inadequate sepsis diagnosis following liver transplantation has significant collateral
55
56 consequences such development of septic shock, overtreatment and exposure to large
57
58 spectrum antibiotherapy in suspected cases with selection of resistant pathogens.
59
60

1
2
3
4
5
6 From a biological perspective, better characterization of post-LT immunological status may
7
8 help to answer two main questions: 1) is this period of immunological recovery associated
9
10 with altered phenotypic and functional capacity to respond to pathogens? and 2) is this period
11
12 share similarities with the well described sepsis-induced immunodepression state seen in
13
14 critically ill patient? The results may provide pathophysiologic basis for anti-infective
15
16 immune modulation, prophylactic antibiotherapy/antibiotic stewardship, but also setting
17
18 adapted immune-infective monitoring and surveillance.
19
20
21
22
23
24

25 **Hypothesis**

26
27
28 To overcome the lack of knowledge on phenotypic and immune status following liver
29
30 transplantation, the SEPTIFOIE study propose to prospectively characterize the immunologic
31
32 status during the first two weeks following liver transplantation in children. Biological
33
34 biomarkers, whole blood cells phenotyping as well as immune functional assays will be
35
36 performed before surgery and on day 3, 7 and 14 after liver transplantation. Reference values
37
38 will be determined and correlation between the biological measurements and occurrence of
39
40 post-operative sepsis performed. To explain the increase susceptibility of post-transplant
41
42 children for sepsis, we hypothesized that per-operative massive haemorrhage/transfusion,
43
44 systemic ischemia-reperfusion expose children with primed acquired immune dysfunction,
45
46 due the end-stage liver disease and cirrhosis, to a post-operative severe immune dysfunction,
47
48 with progressive immunity restauration. Both timing and intensity of dysfunctional immunity
49
50 will be described. Therefore, beside phenotypic and functional characterization of the immune
51
52 response, specific analysis of the functional immune capacity to respond to pathogen will be
53
54 tested. The SEPTIFOIE project will provide reference status on anti-infective immunity
55
56
57
58
59
60

1
2
3 following liver transplantation permitting to better interpret conditions and biomarkers
4
5 deviating from uncomplicated post-operative course.
6
7
8
9

10 **Aims and objectives**

11
12 The primary objective of this study is to characterize relations between infective
13
14 complications and immune functional status illustrated by the activation of monocytes
15
16 (mHLA-DR, CD11b) and neutrophils (CD16, CD18) during the first 14 days following liver
17
18 transplantation in children. The secondary objectives are:
19
20
21

- 22
23 ➤ To evaluate kinetics of serum biomarkers in patients developing or not post-operative
24
25 sepsis (Interleukin (IL)-6, IL-8, IL12p70, TNF α , IL-10, IP-10, IFN γ)
26
27
- 28
29 ➤ To evaluate kinetics of cellular phenotypes in patients developing or not post-
30
31 operative sepsis (lymphoid and myeloid cells phenotypes)
32
33
- 34
35 ➤ To evaluate kinetics of transcriptional signature of patients developing or not post-
36
37 operative sepsis.
38
39
- 40
41 ➤ To evaluate immune functional capacity in patients developing or not post-operative
42
43 sepsis (*ex-vivo* phagocytosis and opsonophagocytosis, *in-vitro* plasmatic toxicity
44
45 including superoxide production)
46
47
- 48
49 ➤ To describe critically ill immunodepression through measures of mHLA-DR
50
51 expression following liver transplantation.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

METHODS AND ANALYSIS

SEPTIFOIE is a prospective longitudinal, single centre, observational study conducted in the Paediatric Intensive Care Unit of the AP-HP Paris Saclay University, Bicêtre Hospital.

Study population

In this project, patients will be enrolled among children with end-stage liver disease requiring liver transplantation and referred to the Bicêtre Hospital, national referral centre for paediatric liver disease and transplantation.

- All patients will be referred for management of chronic liver disease, acute liver failure and liver transplantation.
- The study (reference number: 2021-A01626-37/NI 11055) is coordinated by the Département de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI) of the Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP).

All children will be followed clinically during the first 14 days following liver transplantation. The length of the follow-up was decided as being the riskiest period in terms of occurrence of infective complications defined by a retrospective analysis of more than 300 paediatric liver transplantation in our centre [2].

Definitions and diagnosis.

Sepsis diagnosis will be established based on the Sepsis 3 definition with paediatric adaptation of the SOFA score (P-SOFA) [29,30]. Shortly, patients with suspected infection with more than two organ failure are defined as “sepsis”. Lack of hemodynamic response to fluid therapy and requirement of vaso-inotropic support associated with a serum lactate >2 mmol/L are defined as “septic shock” [31,32]. All patients will have concurrent clinical examination and standardized workup including hemogram, C-Reactive Protein (CRP) and/or procalcitonin (PCT) and microbiological cultures including blood, urine and ascites/peritoneal drainage as well as systematic molecular diagnosis of viral infection (herpes viridae virus,

1
2
3 adenovirus). Diagnosis of secondary infection will be established according to IDSA
4
5 definition [33–35]. Initial screening and diagnosis will be performed according to the sepsis
6
7 management recommendation of the surviving sepsis campaign, and sepsis and septic shock
8
9 management will be left at the discretion of paediatric intensivist in charge of the patient
10
11 according to current international recommendation [36]. Although the causes and
12
13 consequences are fundamentally different, the clinical presentation of acute graft rejection and
14
15 secondary infection are closely similar with the development of an inflammatory syndrome,
16
17 organ injury and failure. Acute graft rejection diagnosis will be establish following histologic
18
19 analysis of liver biopsy and graded according to the Banff classification [37]
20
21
22
23
24
25

26 **Sample and clinical data collection**

27
28 Clinical and biological (Biobanking) data dedicated to this project will be gathered according
29
30 to Table 1. For the various biological tests to be performed in this study, the sample collection
31
32 will allow us to establish several types of biobanking:
33
34

- 35 1. Heparin plasma for the study of protein biomarkers, opsonophagocytosis and plasma
36
37 cytotoxicity tests.
38
39
- 40 2. mRNA biobank to study transcriptomic host biomarkers (RNA will be extracted from
41
42 whole blood collected in PAXgene tubes);
43
44
- 45 3. genomic DNA biobank to analyse potential polymorphism associated with studied
46
47 biomarkers (eg. CIITA rs3087456)
48
49
50

51 **Biomarkers measurements**

- 52
53 1. Proteic biomarkers will be measured by Luminex multiplexing methods (Bio-Plex
54
55 MAGPIX, Biorad, Hercules, CA)
56
57
- 58 2. Cell phenotypes will be analysed by flow cytometry (Attune, ThermoFisher),
59
60

3. Transcriptional signature will be performed by sequencing of pre-stabilized RNA and quantitative PCR (CFX90 Q-PCR, Biorad, Hercules, CA).
4. Genetic variants may be analysed (either through WGS or specific PCR)

Dynamic immune profiles

Here, we plan to study the immune function before and of the first 14 days after liver transplantation of age. We foresee the following analysis:

- 1) Selected commercialized proteic biomarkers of sepsis will be tested on freshly separated and freezed serum (PCT, IP-10, IL-6, ...)
- 2) Whole blood phenotypes and activation will be analysed. Quantification of T, B, NK cells, monocytes and neutrophils, including sub-population will be measured. More specifically, Myeloid-derived suppressor cells (monocytes and polymorphonuclear), mature and immature neutrophils (CD16 +/-) and Treg will be described. Immunodepression severity as quantified by measuring monocytes (m)HLA-DR will be performed. All phenotypic analysis will be performed on fresh whole blood using a point-of-care flow cytometer in the unit (24/7).
- 3) *Ex vivo* functionality of the innate response via TLRs stimulation. Whole blood stimulation with TLRs agonists (LPS, FSL1, Pam3CSK4, Flagellin, PolyI:C, CPG-ODN, Imiquimod & Resiquimod) (Sigma, Darmstadt, Germany) with measurements of cytokines/chemokine (IL6, IL10, TNF α) in supernatants (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and genes transcripts quantification by Q-PCR. Opsonophagocytosis and phagocytosis functional test will be performed using standardised flow cytometric methods [38]. Plasma toxicity test will be performed using THP-1 cell lines exposed to plasma heat-inactivated bacteria (*E. coli*, *S. aureus*) and purified endotoxins (LPS). Cell death, apoptosis and caspase activation will be quantified using flow cytometry. *Ex vivo* stimulation test and phagocytosis assay will

1
2
3 be performed on heparinized blood sample within 24 hours of sampling.
4

5 Opsonophagocytosis and plasma toxicity tests will be performed once the study
6
7 recruitment is completed.
8

- 9
10 4) Transcriptomic and genomic analysis will be analysed using freshly freezed sample.
11
12 RNA will be stabilized in PAXgene (PAXgene Blood RNA, PreAnalytiX,
13
14 Hombrechtikon, Switzerland) and stored for analysis. All analysis will be performed
15
16 once the study recruitment is completed using available methods (WGS,
17
18 transcriptomic, or PCR/Q-PCR).
19
20
21
22
23
24

25 **Sample size and data analysis plan**

26
27 Statistical analysis will be handled by the Clinical Research Unit of the AP-HP Paris Saclay
28
29 University using SAS® software (current version at the time of analysis). The analysis will be
30
31 established based on data analysis plan (DAP) validated by the principal investigator and
32
33 statisticians. The projected recruitment is 60 patients over 35 months (40-50 patients
34
35 transplanted per year, 80% inclusion rate, i.e. 30 patients/year). Only transplanted patients
36
37 will be described. Their demographic and clinical characteristics collected up to anaesthetic
38
39 induction before the start of transplantation will be described in terms of number, mean,
40
41 standard deviation, minimum, maximum, median and interquartile range for continuous
42
43 quantitative data, in terms of number and percentage for categorical qualitative or quantitative
44
45 data: age, sex, weight, height, disease causing liver transplantation, treatments.
46
47
48
49

50
51 The primary endpoint was the occurrence of at least one septic complication and/or rejection
52
53 between D0 and D14. As a preliminary step, the evolution of each factor for each patient as
54
55 well as the average evolution in each group (uninfected patients without rejection (controls) /
56
57 patients with septic complications and/or rejection) will be illustrated graphically. Initially,
58
59 depending on the number of factors with a potential relationship with the primary endpoint, a
60

1
2
3 Principal Component Analysis (PCA) or a Hierarchical Ascending Classification (HAC) will
4
5 be implemented at each sampling date planned in the study (Day 3, Day 7, Day 14) to
6
7 determine factors in common to all uninfected patients without rejection (controls) and factors
8
9 in common to all patients with sepsis and/or rejection complications. In the case of a PCA, the
10
11 variable of existence of rejection/infection will be considered as an illustrative variable. In a
12
13 second step, the factors detected in the first step will be entered simultaneously (multivariate
14
15 analysis) into a mixed generalized linear regression model. This modelling was preferred to
16
17 the GEE (Global Estimating Equation) modelling because it is rather the effects on the
18
19 average individual that are sought (Cf Logistic regression for different types of
20
21 epidemiological studies by Thierry Duchesne. Scientific meeting 5 November 2007) and that
22
23 time probably influences the explanatory factors. The model will be of the type:
24
25
26
27

$$28 \text{Log} [P(Y_{ij}=1) / (1-P(Y_{ij}=1))] = A_i + \sum_k B_{i,k} Z_{i,j,k} + \sum_k \beta_k Z_{i,j,k} + \sum_k \beta_k x_{i,j,k} + \varepsilon$$

29
30
31 With $P(Y_{ij}=1)$ Probability that patient i at time j has septic complications and/or rejection; A_i
32
33 Patient i dependent constant (random); $B_{i,k}$ Regression coefficient of the k th factor for patient
34
35 i (random); $Z_{i,j,k}$ Value of the k th factor measured at time j for patient i ; β_k Coefficient of
36
37 regression of the k th factor or covariate (fixed); $x_{i,j,k}$ Value of the k th covariate for patient i
38
39 measured at time j ; ε Residual.
40
41
42

43
44 A_i and $B_{i,k}$ are assumed to be independent between subjects but also between them within a
45
46 patient.
47

48
49 The model will be implemented with an unstructured matrix of intra-patient variance-
50
51 covariance. Other types of matrix (diagonal, AR) can be used if necessary. The effect of the
52
53 factors detected in the first stage will come a priori from the addition of a random effect (from
54
55 the intra-patient variability) with a fixed effect (from the inter-patient variability). Among the
56
57 fixed effect variables (covariates), age, sex, weight, height, disease at the origin of the liver
58
59 transplantation, treatments, baseline values can also be taken into account. The final list of
60

1
2
3 fixed effect variables will be specified in the SAP. A relationship between a factor (detected
4
5 in the first step) and the existence of septic complications and/or rejection will be significant
6
7 if the coefficient of the corresponding fixed effect is significant.
8
9

10 Subject to the size of the population, the validity of the model will be tested by separating the
11
12 data into 2 sub-samples: the first will be used to develop the model and the second will be
13
14 used to test the ability of the model to indicate whether the patient is at risk of septic
15
16 complications and/or rejection between D0 and D14 or not. Additional sensitivity analyses
17
18 may be conducted to assess the impact of missing data, depending on their number. Details of
19
20 these analyses will be provided in the SAP.
21
22
23

24 Secondary analyses: All or part of the methodology used for the analysis of the primary
25
26 endpoint will be reused for the analysis of the secondary endpoint "Existence of at least one
27
28 septic complication between D0 and D14"; subjects who showed infection will then be
29
30 compared to those who did not develop infection (with or without rejection). All or part of the
31
32 methodology used for the analysis of the primary endpoint will be reused for the analysis of
33
34 the secondary endpoint "Existence of at least one rejection between D0 and D14"; patients
35
36 who developed a rejection will then be compared to patients who did not develop a rejection
37
38 (with or without infection). Details of the statistical analyses that will be used to determine
39
40 cut-off values for biological variables will be given in the SAP. The number of infections and
41
42 rejections will be calculated, their clinical characteristics (sepsis/severe sepsis/septic shock for
43
44 infection, Banff classification for acute rejection) described (purely descriptive analyses).
45
46 Concerning biology, the results of the different analyses (either routine care or specific to
47
48 research) will be described day by day (purely descriptive analyses). Correlations between
49
50 leukocytosis, CRP and quantitative parameters of liver function will be calculated by
51
52 Spearman's coefficient at each sampling date planned in the study (Day 3, Day 7, Day 14).
53
54
55
56
57
58
59
60

ETHICS AND DISSEMINATION

Ethics approval

Ethical approval has been obtained from the Comité de Protection des Personnes (CPP Ile-de-France VII) on October 15, 2014 (reference number PP14-031), the study declared to the Commission Nationale de l'Information et des Libertés (CNIL declaration number: 1787808v0), and the biobanking declared to the Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM reference number 2014-A01048-39, on 24/06/2014) according to French regulation. This study complies with the Declaration of Helsinki principles of Good Practice and the Nagoya protocol.

Informed consent

- Legal representative of children involved in the study as well as children by their own if able to understand the study will be informed by the investigator. Consent of both legal representatives will be obtained.
- According to the Public Health Code (L. 1122-2), when a study is involving a minor, consent is given by the legal representatives.
- Legal representatives are loyally and fully informed of the study, its objectives, requirements, potential risks, and their right to refuse the participation of their child and the possibility to stop the study at any time. All the information covering the study are found in an explanatory notice. According to the Public Health Code (L. 1122-1), minor patients receive an explanatory notice of the study formatted for their level of comprehension.
- Copy of signed and dated informed consent is provided to the legal representatives and to the investigator. An additional copy will be stored and archived by the study coordinator.

- The consents will be kept by the DRCI premises for 15 years

Safety of participants

This study includes no serious foreseeable risk to the health of the children involved. The only potential risk is related to blood sample collection (maximum total blood per sampling 1mL/Kg, collected over all time points).

Study management

The study is coordinated by Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation – DRCI). The study will follow the institutional standard operating procedures (SOP).

Data management and handling

For each patient, an electronic Case Report Form (eCRF; Cleanweb www.cleanweb.aphp.fr, Telemedecine Technologies SAS, Boulogne-Billancourt, France) including socio-demographic, anthropometric, clinical and paraclinical information will be completed by clinical assistants and investigators. All samples and initial processing of the biobanking will be performed in the PICU. Cell phenotyping, *in-vitro* and *ex-vivo* functional immune testing will be performed in the research lab of the PICU at the AP-HP Paris Saclay University, Bicêtre Hospital. Plasma and transcriptional biomarkers will be transferred for analysis to the Institute of Integrative Biology of the Cell (CNRS, CEA, Paris Saclay University), Gif sur Yvette, France. Biobanking samples will be stored at -80degC for 15 years.

Medical confidentiality

All the data collected on the eCRF will be pseudonymised and covered by medical confidentiality. To protect the participant's confidentiality, samples will be de-identified. The

20

1
2
3 investigator will ensure that confidentiality is maintained. All patients will be identified by
4
5 their patient ID reference and an unique alpha-numeric code defined by the centre code,
6
7 inclusion number and their name and surname initials (CCC-XX-NS). The unique patient
8
9 code will be used on the eCRF or on all other documents and samples. Patient data, identified
10
11 by the ID code will be stored separately. The investigator will ensure the retention of the
12
13 identification list of patients included in the study. All the eCRF will be kept by DRCI
14
15 premises for at least 15 years. Access to eCRF is set according to legal and reglementary
16
17 rules, notably the articles L.1121-3 et R.5121-13 from the French health code. As part of data
18
19 processing, data consultation and data analysis performed in France, all patients will be
20
21 informed of the data processing procedure as well as their rights including the right of access
22
23 to and the right of opposition to the transmission of the data. Professional secrecy will be
24
25 respected by all the persons participating in the conduct of a study. The manager, the
26
27 investigator and all their collaborators undertake the responsibility to not transmit to a third
28
29 party any of the confidential information obtained through this research, including
30
31 information on the health status of the subjects or on the current study.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Twitter** Pierre Tissières @PierreTissieres
4
5
6

7
8 **Acknowledgements** The project is funded by a grant from programme Hospitalier de
9
10 Recherche Clinique – PHRC 2012 (Ministère de la Santé, EUD/IDRCB2012-A01626-37).
11
12

13
14 **Collaborators** SEPTIFOIE study group collaborators:
15

16
17 Paediatric Intensive Care: Clémence MARAIS, Caroline CLAUDE, Nada SEMAAN, Pierre
18
19 TISSIERES, Jordi MIATELLO, Philippe DURAND, Luc MORIN
20

21
22 Paediatric Hepatology: Emmanuel JACQUEMIN, Emmanuel GONZALES, Dalila HABES,
23
24 Bogdan HERMEZIU, Oanez ACKERMANN
25

26
27 Paediatric Surgery: Sophie BRANCHERAU, Florent GUERIN, Virginie FOUQUET,
28
29 Géraldine HERY
30

31
32 Paediatric Anaesthesiology: Catherine BAUJARD, Philippe ROULLEAU, Guiseppe STAITI
33

34
35 Paediatric Radiology: Stéphanie FRANCHI-ABELLA
36

37
38 Institute of Integrative Biology of the Cell: Luis AUGUSTO, Sem EZINMEGNON
39

40 **Contributors** PT, HA conceived and designed the study. JM, CM, CC, NS, PT manage
41
42 infants follow up in the field hospital and in the lab. SB, HA managed administrative and
43
44 reglementary duties. JM, CM, CC, NS, PT analyzed the data. JM, PT drafted and finalized the
45
46 manuscript. JM, CM, CC, NS, SB, HA, PT revised the manuscript. The final manuscript was
47
48 read and approved by all authors.
49
50
51

52
53
54
55 **Competing interest's statement** All authors declare that this research was conducted in the
56
57 absence of any commercial or financial relationship that could cause potential conflict of
58
59 interest.
60

1
2
3
4
5
6 **Patient and public involvement** Patients and/or the public were involved in the design, or
7
8 conduct, or reporting, or dissemination plans of this research. Refer to the methods section for
9
10 further details

11
12
13
14
15
16 **Patient consent for publication** Not required

17
18
19
20
21 **Provenance and peer review** Not commissioned, externally peer review

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

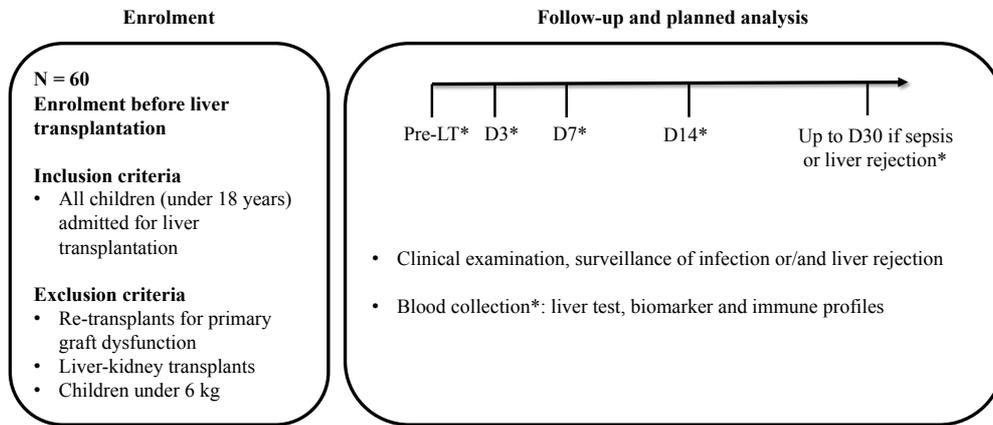
- 1 Shepherd RW, Turmelle Y, Nadler M, *et al.* Risk factors for rejection and infection in pediatric liver transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2008;**8**:396–403. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02068.x
- 2 Dohna Schwake C, Guiddir T, Cuzon G, *et al.* Bacterial infections in children after liver transplantation: A single-center surveillance study of 345 consecutive transplantations. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* 2019;:e13208. doi:10.1111/tid.13208
- 3 Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 2021;**47**:1181–247. doi:10.1007/s00134-021-06506-y
- 4 Moreau R, Jalan R, Gines P, *et al.* Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 2013;**144**:1426–37, 1437.e1-9. doi:10.1053/j.gastro.2013.02.042
- 5 Galbois A, Aegerter P, Martel-Samb P, *et al.* Improved prognosis of septic shock in patients with cirrhosis: a multicenter study*. *Crit Care Med* 2014;**42**:1666–75. doi:10.1097/CCM.0000000000000321
- 6 Claude C, Deep A, Kneyber M, *et al.* pCLIF-SOFA is a reliable outcome prognostication score of critically ill children with cirrhosis: an ESPNIC multicentre study. *Ann Intensive Care* 2020;**10**:137. doi:10.1186/s13613-020-00753-w
- 7 Vieira SMG, Schwengber FP, Melere M, *et al.* The first episode of spontaneous bacterial peritonitis is a threat event in children with end-stage liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2018;**30**:323–7. doi:10.1097/MEG.0000000000001046
- 8 Pearl MH, Zhang Q, Palma Diaz MF, *et al.* Angiotensin II Type 1 receptor antibodies are associated with inflammatory cytokines and poor clinical outcomes in pediatric kidney transplantation. *Kidney Int* 2018;**93**:260–9. doi:10.1016/j.kint.2017.06.034
- 9 Trebicka J, Amoros A, Pitarch C, *et al.* Addressing Profiles of Systemic Inflammation Across the Different Clinical Phenotypes of Acutely Decompensated Cirrhosis. *Front Immunol* 2019;**10**:476. doi:10.3389/fimmu.2019.00476
- 10 Antoniadis CG, Berry PA, Wendon JA, *et al.* The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol* 2008;**49**:845–61. doi:10.1016/j.jhep.2008.08.009
- 11 Adams DH, Sanchez-Fueyo A, Samuel D. From immunosuppression to tolerance. *J Hepatol* 2015;**62**:S170-185. doi:10.1016/j.jhep.2015.02.042
- 12 Rosen HR. Transplantation immunology: what the clinician needs to know for immunotherapy. *Gastroenterology* 2008;**134**:1789–801. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.062
- 13 de Goër de Herve M-G, Gonzales E, Hendel-Chavez H, *et al.* CD25 appears non essential for human peripheral T(reg) maintenance in vivo. *PloS One* 2010;**5**:e11784. doi:10.1371/journal.pone.0011784

- 1
2
3 14 Baranwal AK, Mehra NK. Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A
4 (MICA) Molecules: Relevance in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*
5 2017;**8**:182. doi:10.3389/fimmu.2017.00182
6
7
8 15 Mazariegos GV, Reyes J, Marino IR, *et al.* Weaning of immunosuppression in liver
9 transplant recipients. *Transplantation* 1997;**63**:243–9. doi:10.1097/00007890-199701270-
10 00012
11
12 16 Marshall JC, Reinhart K, International Sepsis Forum. Biomarkers of sepsis. *Crit Care*
13 *Med* 2009;**37**:2290–8. doi:10.1097/CCM.0b013e3181a02afc
14
15 17 Oike F, Yokoi A, Nishimura E, *et al.* Complete withdrawal of immunosuppression in
16 living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2002;**34**:1521. doi:10.1016/s0041-
17 1345(02)02980-9
18
19
20 18 Hurwitz M, Desai DM, Cox KL, *et al.* Complete immunosuppressive withdrawal as a
21 uniform approach to post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric liver
22 transplantation. *Pediatr Transplant* 2004;**8**:267–72. doi:10.1111/j.1399-
23 3046.2004.00129.x
24
25
26 19 Crispe IN, Giannandrea M, Klein I, *et al.* Cellular and molecular mechanisms of liver
27 tolerance. *Immunol Rev* 2006;**213**:101–18. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00435.x
28
29 20 Horst AK, Neumann K, Diehl L, *et al.* Modulation of liver tolerance by conventional and
30 nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cell Mol Immunol*
31 2016;**13**:277–92. doi:10.1038/cmi.2015.112
32
33 21 Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident
34 antigen-presenting cell. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001;**49 Suppl 1**:S7-11.
35
36 22 Nobre V, Harbarth S, Graf J-D, *et al.* Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment
37 duration in septic patients: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**177**:498–
38 505. doi:10.1164/rccm.200708-1238OC
39
40 23 Calvano SE, Xiao W, Richards DR, *et al.* A network-based analysis of systemic
41 inflammation in humans. *Nature* 2005;**437**:1032–7. doi:10.1038/nature03985
42
43 24 Prucha M, Ruryk A, Boriss H, *et al.* Expression profiling: toward an application in sepsis
44 diagnostics. *Shock Augusta Ga* 2004;**22**:29–33. doi:10.1097/01.shk.0000129199.30965.02
45
46 25 Tang BMP, McLean AS, Dawes IW, *et al.* Gene-expression profiling of peripheral blood
47 mononuclear cells in sepsis. *Crit Care Med* 2009;**37**:882–8.
48 doi:10.1097/CCM.0b013e31819b52fd
49
50 26 Pachot A, Lepape A, Vey S, *et al.* Systemic transcriptional analysis in survivor and non-
51 survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunol Lett* 2006;**106**:63–71.
52 doi:10.1016/j.imlet.2006.04.010
53
54 27 Wong HR, Shanley TP, Sakthivel B, *et al.* Genome-level expression profiles in pediatric
55 septic shock indicate a role for altered zinc homeostasis in poor outcome. *Physiol*
56 *Genomics* 2007;**30**:146–55. doi:10.1152/physiolgenomics.00024.2007
57
58
59
60

- 1
2
3 28 Payen D, Lukaszewicz A-C, Belikova I, *et al.* Gene profiling in human blood leucocytes
4 during recovery from septic shock. *Intensive Care Med* 2008;**34**:1371–6.
5 doi:10.1007/s00134-008-1048-1
6
7 29 Dolin HH, Papadimos TJ, Stepkowski S, *et al.* A Novel Combination of Biomarkers to
8 Herald the Onset of Sepsis Prior to the Manifestation of Symptoms. *Shock Augusta Ga*
9 2018;**49**:364–70. doi:10.1097/SHK.0000000000001010
10
11 30 Morin L, Hall M, de Souza D, *et al.* The Current and Future State of Pediatric Sepsis
12 Definitions: An International Survey. *Pediatrics* 2022;**149**:e2021052565.
13 doi:10.1542/peds.2021-052565
14
15 31 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, *et al.* The Third International Consensus
16 Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;**315**:801–10.
17 doi:10.1001/jama.2016.0287
18
19 32 Richter RP. International Perspective on a Revised Pediatric Sepsis Definition. *Pediatrics*
20 2022;**149**:e2022056410. doi:10.1542/peds.2022-056410
21
22 33 Tm H, Sf B, Dd C, *et al.* Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated
23 urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the
24 Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*
25 2010;**50**. doi:10.1086/650482
26
27 34 Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, *et al.* Management of Adults With Hospital-
28 acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the
29 Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect*
30 *Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2016;**63**:e61–111. doi:10.1093/cid/ciw353
31
32 35 Mermel LA, Allon M, Bouza E, *et al.* Clinical practice guidelines for the diagnosis and
33 management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious
34 Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2009;**49**:1–45.
35 doi:10.1086/599376
36
37 36 Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, *et al.* Surviving Sepsis Campaign International
38 Guidelines for the Management of Septic Shock and Sepsis-Associated Organ
39 Dysfunction in Children. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr*
40 *Intensive Crit Care Soc* 2020;**21**:e52–106. doi:10.1097/PCC.0000000000002198
41
42 37 Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, *et al.* 2016 Comprehensive Update of the Banff
43 Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated
44 Rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*
45 2016;**16**:2816–35. doi:10.1111/ajt.13909
46
47 38 Tissières P, Ochoda A, Dunn-Siegrist I, *et al.* Innate immune deficiency of extremely
48 premature neonates can be reversed by interferon- γ . *PloS One* 2012;**7**:e32863.
49 doi:10.1371/journal.pone.0032863
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

Figure 1



Schematic design of the sepsis study illustrating inclusion, planned biological analysis and follow-up time points

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1 Clinical and biological data collection planning

	Pre-LT	D3	D7	D14	Sepsis	Liver rejection
PATIENTS CHARACTERISTICS						
Inclusion/exclusion criteria	x					
Consent form	x					
Demography	x					
STANDARD BIOLOGY						
Liver function test	x	x	x	x	x	x
Haemostasis test	x	x	x	x	x	x
WBC	x	x	x	x	x	x
B NK T cell phenotyping	x			x	x	x
Procalcitonin, CRP	x	x	x	x	x	x
Immunoglobulins G, M, A quantification	x		x	x		
Determination of complement proteins C3 C4 and CH50 activity	x		x	x		
EXPERIMENTAL BIOLOGY						
Heparin tube sampling (cell phenotype, serum, DNA)	x	x	x	x	x	x
EDTA tube sampling (plasma)	x	x	x	x	x	x
PAXgen tube sampling (RNA)	x	x	x	x	x	x

D, Day; WBC, whole blood count; T, B, lymphocytes and NK cells; C, complement

RÉCÉPISSÉ

DÉCLARATION NORMALE

Numéro de déclaration

1787808 v 0

du 14-08-2014

Monsieur AUCAN Christophe
 ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX DE PARIS
 DRCD - DEPARTEMENT DE LA RECHERCHE
 CLINIQUE ET DU DEVELOPPEMENT
 1 AVENUE CLAUDE VELLEFAUX
 1 AVENUE CLAUDE VELLEFAUX
 75010 PARIS

A LIRE IMPERATIVEMENT

La délivrance de ce récépissé atteste que vous avez effectué une déclaration de votre traitement à la CNIL et que votre dossier est formellement complet. Vous pouvez mettre en œuvre votre traitement. Cependant, la CNIL peut à tout moment vérifier, par courrier ou par la voie d'un contrôle sur place, que ce traitement respecte l'ensemble des dispositions de la loi du 6 janvier 1978 modifiée en 2004. En tout état de cause, vous êtes tenu de respecter les obligations prévues par la loi et notamment :

- 1) La définition et le respect de la finalité du traitement,
- 2) La pertinence des données traitées,
- 3) La conservation pendant une durée limitée des données,
- 4) La sécurité et la confidentialité des données,
- 5) Le respect des droits des intéressés : information sur leur droit d'accès, de rectification et d'opposition.

Organisme déclarant

Nom : ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX DE PARIS

N° SIREN ou SIRET :

267500452 00011

Service : DRCD - DEPARTEMENT DE LA RECHERCHE CLINIQUE ET
DU DEVELOPPEMENT

Code NAF ou APE :

7220Z

Adresse : 1 AVENUE CLAUDE VELLEFAUX 1 AVENUE CLAUDE
VELLEFAUX

Tél. : 01 44 84 17 09

Fax. : 01 44 84 17 01

Code postal : 75010

Ville : PARIS

Traitement déclaré

Finalité : CARACTERISER LES RELATIONS ENTRE LES COMPLICATIONS IMMUNO-INFECTIONNEUSES ET LE
 PROFIL FONCTIONNEL IMMUNITAIRE INNE DURANT LES JOURS SUIVANT LA GREFFE DU FOIE CHEZ
 L'ENFANT.

Fait à Paris, le 14 août 2014
 Par délégation de la commission



Isabelle FALQUE PIERROTIN
 Présidente

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Comité de Protection des Personnes
Ile-de-France VII

Président : François BOISSY
Vice Président : Pr Vincent GAJDOS
Trésorier : Claude COTTET

Secrétariat :
Madame Brigitte PILATE-DAUSSY
(Forail des Champs - Secteur Bleu - Porte 74 bis - RDC)
e.mail : cpp.idf7.bicetre@wanadoo.fr
site internet : <http://cpp.idf7.bicetre.iles.fr>
Téléphone : 01 45 21 28 46 - Télécopie : 01 45 21 21 45
Portails : 06 21 25 49 30

Monsieur MISSE
DRCD
DIRC
Hôpital Saint Louis
1 avenue Claude Vellefaux
75475 PARIS CEDEX 10

Premier Collège
Florence FAYARD
Vincent GAJDOS
Renard de BEAUREPAIRE
Hélène AGOSTINI
Simone BENVENUE
Michel BOTTLAENDER
François HIRSCH

Kremlin Bicêtre le 15 octobre 2014

Anne-Marie TABURET
Danièle BLONDELON

Protocole n° PP 14-031
N° :
ID RCB :
(N° à rappeler dans toute correspondance)

Catherine ASTOUL
Brigitte LBY

Deuxième Collège
Jacques CARRE
Pascal CASABLANC

Monsieur,

Sylvie SCHWAB

Le comité a étudié le projet d'étude que vous avez présenté et intitulé : « **SEPTIFOIE : PROFIL FONCTIONNEL IMMUNITAIRE INNE APRES GREFFE DU FOIE CHEZ L'ENFANT COMME FACTEUR PREDICTIF DE COMPLICATIONS INFECTIEUSES** » présenté par le Professeur Pierre TISSIERES du CHU de Bicêtre.

Michèle ORBACH ROULIERE

D'après les informations communiquées au Comité de Protection des Personnes, il s'agit d'une étude dont l'objectif est de caractériser les relations entre les complications immuno-infectieuses et le profil fonctionnel immunitaire inné durant les jours suivant la greffe de foie chez l'enfant.

Françoise BOISSY
Valérie-Ann LAFAY

Cette étude nécessite la réalisation de prélèvements sanguins au moment de la greffe, et dans les jours qui suivent. Ce prélèvement sera réalisé à l'occasion de prélèvements sanguins réalisés dans le cadre du soin, sans ponction supplémentaire et les volumes de ces prélèvements sont contrôlés.

Annie LABBE
Myriam ZARRA
Georges MARDUEL
Claude COTTET

Il s'agit donc d'une étude non interventionnelle qui ne modifie en rien la prise en charge des patients et ne rentre donc pas dans le cadre de la loi sur la recherche biomédicale. Le comité de protection des personnes n'est pas fondé à donner un avis officiel. Toutefois, il considère qu'il n'y a pas d'obstacle éthique à la réalisation de cette étude.

Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII
CHU de BICETRE - 78 rue du Général Leclerc - 94275 LE KREMLIN BICETRE CEDEX

1 DIRECTION DE L'ORGANISATION MEDICALE
2 ET DES RELATIONS AVEC LES UNIVERSITES
3
4 **Département de la Recherche
5 Clinique et du Développement (DRCD)**
6
7 *Groupeur Inter Régional de Recherche Clinique
8 et d'Innovation d'Ile de France (GIRCI)*
9
10 *Cane Historique de l'Hôpital Saint-Louis
11 Secteur Cris - Porte 23
12 1 avenue Claude Vellefaux - 75476 Paris
13 Fax : 01 44 84 17 83 / 93
14 <http://rechercheclinique.ap-hopi.fr>*

15 Président du GIRCI Ile-de-France	01 44 84 46 61
16 Pr. Jean-François CHAMMART	
17 Directeur DRCD	01 44 84 17 87
18 Christophe NESSE	
19 Adjoint au Directeur	01 44 84 17 75
20 Elisabeth GUILLAUME	
21 Coordonnateur médical	01 44 84 17 77
22 Pr. Olivier CHASSAGNY	
23 Coordonnateur de pilotage académique	01 40 27 96 63
24 Serge BURCAU	
25 Conseiller Scientifique	01 44 84 55 49
26 Pr. Philippe LECHAT	
27 Assistante de direction	01 44 84 17 23
28 Laurence COMER-TANNGI	
Chefs de Projet et Chefs de Projet - Assistants	
Neurosciences, Neurologie, Psychiatrie	
29 Amel CUSLMANI	01 44 84 17 25
30 Blodie SOLER	01 44 84 17 25
31 Yannick VACHER	01 44 84 17 30
32 Houma HEGBERER	01 44 84 17 16
33 Tatiana ANDRIANANJOMANJANA	01 44 84 17 64
Généraliste et Rhumatisme	
34 Christophe AUCAN	01 44 84 17 05
35 Shahreh AZIM	01 44 84 17 19
Cancer	
36 Isabelle BRINDEL	01 44 84 17 80
37 Sylvie FRIEUR	01 44 84 17 92
38 Zohra BICER	01 44 84 17 47
39 Coralie VILLERET	01 40 22 22 86
Médecine Infectieuses, Maladies, Réanimation	
40 Cécile KECZLA	01 44 84 17 33
41 Fadila ANEKALI	01 44 84 17 17
Cirrhose, Hépatologie, Nutrition, Maladies Infectieuses	
42 Aurélien GUMFACK	01 44 84 17 98
43 Christine LANGE	01 44 84 17 68
44 Myriam TOLHANS-CARRIER	01 44 84 17 52
45 N	01 44 84 17 64
46 Sahla DANE	01 44 84 17 45
Immunologie, Rhumatologie, Endocrinologie	
47 Valérie MULLER	01 44 84 17 51
48 Katrine SEYMOUR	01 44 84 17 42
Santé Publique	
49 Agnès DORON	01 44 84 17 38
50 Emmanuelle LIBSEY	01 44 84 17 53
Technologies pour la Santé	
51 Cécile HOFFMANN-JOURDAN	01 44 84 17 32
52 Micaëla DARBACH	01 44 84 17 32
53 Florence GAYARD-LEMOIR	01 44 84 17 12
54 Annie BERGERA	01 44 84 17 24
55 Alain SOLIAG	01 44 84 17 15
56 Karine GOUDE	01 44 84 17 22
Diététiciens	
57 Cécile BOUTON	01 44 84 17 46
58 Séphanie DIOSZEGHY	01 46 27 57 21
59 Charlotte WALHAT	01 40 27 55 91
60 Pauline CAUSSEUR	01 44 84 17 48
Mirella TOY RIGOU	01 44 84 17 43
Danièle VANHOVE	01 44 84 17 93
Ilots Appel d'offre	
N.	01 40 27 55 33
Correspondant S.I.	
Vincent AKOZI	01 44 84 17 43



Paris, le 05 DEC. 2014

GH Hôpitaux universitaires Paris Sud
Hôpital Bicêtre
Case APHP

**A l'attention de Madame Elsa GENESTIER
Directrice**

Objet : mise en place d'une recherche non interventionnelle

Réf. : NI11055, SEPTIFOIE à rappeler dans toute correspondance.

Dossier suivi par :
Christophe AUCAN (Tél. : 01.44.84.17.09)

Madame la Directrice,

Je vous informe que l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris souhaite mettre en place dans votre groupe hospitalier, la recherche intitulée "Profil fonctionnel immunitaire inné après greffe du foie chez l'enfant comme facteur prédictif de complications infectieuses", dont le Pr. TISSIERES (Service de Réanimation Pédiatrique, Hôpital BICETRE) est l'investigateur coordonnateur.

La recherche sera aussi conduite localement par le Docteur Emmanuel GONZALES - Service d'Hépatologie Transplantation Hépatique Pédiatriques (Hôpital BICETRE), le Docteur Florent GUERIN - Service de Chirurgie Pédiatrique à orientation viscérale (Hôpital BICETRE).

Cette recherche, dont le gestionnaire est l'AP-HP, a été qualifiée de recherche non interventionnelle, en application des articles L. 1121-1 et R. 1121-2 du code de la santé publique.

Vous trouverez ci-joint le protocole de la recherche, la note d'information et le formulaire de consentement, l'accusé de réception de la CNIL.

La date théorique du début de la recherche est fixée au 05/01/2015, pour une durée de 36 mois.

REFERENCES

- Abraham E, Laterre PF, Garg R *et al.* Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med* 2005;**353**:1332–41.
- Accolla RS. Human B cell variants immunoselected against a single Ia antigen subset have lost expression of several Ia antigen subsets. *J Exp Med* 1983;**157**:1053–8.
- Adrie C, Lugosi M, Sonnevile R *et al.* Persistent lymphopenia is a risk factor for ICU-acquired infections and for death in ICU patients with sustained hypotension at admission. *Ann Intensive Care* 2017;**7**, DOI: 10.1186/s13613-017-0242-0.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;**4**:499–511.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;**29**:1303–10.
- Angus DC, Opal S. Immunosuppression and Secondary Infection in Sepsis: Part, Not All, of the Story. *JAMA* 2016;**315**:1457–9.
- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013;**369**:2063.
- Antcliffe DB, Burnham KL, Al-Beidh F *et al.* Transcriptomic Signatures in Sepsis and a Differential Response to Steroids. From the VANISH Randomized Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;**199**:980–6.
- Armstrong-James D, Teo IA, Shrivastava S *et al.* Exogenous interferon-gamma immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2010;**10**:1796–803.
- Arts RJW, Gresnigt MS, Joosten LAB *et al.* Cellular metabolism of myeloid cells in sepsis. *J Leukoc Biol* 2017;**101**:151–64.

- Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP *et al.* Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* 2020;**369**:1210–20.
- Baffari E, Fiume D, Caiazzo G *et al.* Upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from septic patients. *Hum Immunol* 2013;**74**:1244–50.
- Bahl R, Martines J, Ali N *et al.* Research priorities to reduce global mortality from newborn infections by 2015. *Pediatr Infect Dis J* 2009;**28**:S43-48.
- Beaulieu YB, Leon Machado JA, Ethier S *et al.* Degradation, Promoter Recruitment and Transactivation Mediated by the Extreme N-Terminus of MHC Class II Transactivator CIITA Isoform III. *PLoS One* 2016;**11**:e0148753.
- Benlyamani I, Venet F, Coudereau R *et al.* Monocyte HLA-DR Measurement by Flow Cytometry in COVID-19 Patients: An Interim Review. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2020;**97**:1217–21.
- von Bernuth H, Picard C, Jin Z *et al.* Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 2008;**321**:691–6.
- Bhat KP, Truax AD, Brooks JK *et al.* Association of the 19S proteasomal ATPases with the ATPase-binding domain of CIITA is essential for CIITA stability and MHC class II expression. *Immunol Cell Biol* 2010;**88**:807–16.
- Bodasing N, Seaton RA, Shankland GS *et al.* Gamma-interferon treatment for resistant oropharyngeal candidiasis in an HIV-positive patient. *J Antimicrob Chemother* 2002;**50**:765–6.
- Bontron S, Ucla C, Mach B *et al.* Efficient repression of endogenous major histocompatibility complex class II expression through dominant negative CIITA mutants isolated by a functional selection strategy. *Mol Cell Biol* 1997;**17**:4249–58.
- Boomer JS, To K, Chang KC *et al.* Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *Jama* 2011;**306**:2594–605.
- Bordoni V, Sacchi A, Cimini E *et al.* An Inflammatory Profile Correlates With Decreased Frequency of Cytotoxic Cells in Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2020;**71**:2272–5.

- Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care Lond Engl* 2007;**11**:R49.
- Bronson PG, Criswell LA, Barcellos LF. The MHC2TA -168A/G polymorphism and risk for rheumatoid arthritis: a meta-analysis of 6861 patients and 9270 controls reveals no evidence for association. *Ann Rheum Dis* 2008;**67**:933–6.
- Bronson PG, Goldstein BA, Ramsay PP *et al.* The rs4774 CIITA missense variant is associated with risk of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2011;**12**:667–71.
- Bronte V, Brandau S, Chen S-H *et al.* Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* 2016;**7**:12150.
- Brunialti MKC, Martins PS, Barbosa de Carvalho H *et al.* TLR2, TLR4, CD14, CD11B, AND CD11C EXPRESSIONS ON MONOCYTES SURFACE AND CYTOKINE PRODUCTION IN PATIENTS WITH SEPSIS, SEVERE SEPSIS, AND SEPTIC SHOCK. *Shock* 2006;**25**:351–7.
- Buxadé M, Huerga Encabo H, Riera-Borrull M *et al.* Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5. *J Exp Med* 2018;**215**:2901–18.
- Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE *et al.* Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *J Infect Dis* 1990;**161**:982–7.
- Camacho-Carvajal MM, Klingler S, Schnappauf F *et al.* Importance of class II transactivator leucine-rich repeats for dominant-negative function and nucleo-cytoplasmic transport. *Int Immunol* 2004;**16**:65–75.
- Carrasco-Colom J, Jordan I, Alsina L *et al.* Association of Polymorphisms in IRAK1, IRAK4 and MyD88, and Severe Invasive Pneumococcal Disease. *Pediatr Infect Dis J* 2015;**34**:1008–13.
- Carter MJ, Fish M, Jennings A *et al.* Peripheral immunophenotypes in children with multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2020;**26**:1701–7.

- Casanova J-L, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science* 2007;**317**:617–9.
- Chalk K, Meisel C, Spies C *et al.* Dysfunction of alveolar macrophages after cardiac surgery and postoperative pneumonia?--An observational study. *Crit Care Lond Engl* 2013;**17**:R285.
- Chang CH, Fontes JD, Peterlin M *et al.* Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J Exp Med* 1994;**180**:1367–74.
- Chang K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C *et al.* Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit Care Lond Engl* 2014;**18**:R3.
- Cheng S-C, Scicluna BP, Arts RJW *et al.* Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nat Immunol* 2016;**17**:406–13.
- Chiu E, Gold T, Fettig V *et al.* Identification of a nuclear export sequence in the MHC CIITA. *J Immunol Baltim Md 1950* 2015;**194**:6102–11.
- Choi NM, Majumder P, Boss JM. Regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Curr Opin Immunol* 2011;**23**:81–7.
- Cohen J, Brun-Buisson C, Torres A *et al.* Diagnosis of infection in sepsis: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004;**32**:S466-494.
- Colín-Castro CA, Franco-Cendejas R, Rocha-González HI *et al.* Association of TLR4 gene polymorphisms with sepsis after a burn injury: findings of the functional role of rs2737190 SNP. *Genes Immun* 2021, DOI: 10.1038/s41435-021-00121-z.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;**5**:1219–26.
- Conway Morris A, Datta D, Shankar-Hari M *et al.* Cell-surface signatures of immune dysfunction risk-stratify critically ill patients: INFECT study. *Intensive Care Med* 2018;**44**:627–35.

- Danai PA, Moss M, Mannino DM *et al.* The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest* 2006;**129**:1432–40.
- Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL *et al.* Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin Exp Immunol* 2008;**154**:87–97.
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006;**443**:350–4.
- Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest* 2016;**126**:23–31.
- Delsing CE, Gresnigt MS, Leentjens J *et al.* Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect Dis* 2014;**14**:166.
- Dema B, Martínez A, Fernández-Arquero M *et al.* Autoimmune disease association signals in CIITA and KIAA0350 are not involved in celiac disease susceptibility. *Tissue Antigens* 2009;**73**:326–9.
- Demaret J, Venet F, Friggeri A *et al.* Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2015;**98**:1081–90.
- Devaiah BN, Singer DS. CIITA and Its Dual Roles in MHC Gene Transcription. *Front Immunol* 2013;**4**:476.
- Dignani MC, Rex JH, Chan K-W *et al.* Immunomodulation with interferon-gamma and colony-stimulating factors for refractory fungal infections in patients with leukemia. *Cancer* 2005;**104**:199–204.
- Dimopoulos G, de Mast Q, Markou N *et al.* Favorable Anakinra Responses in Severe Covid-19 Patients with Secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Cell Host Microbe* 2020;**28**:117-123.e1.
- Döcke W-D, Randow F, Syrbe U *et al.* Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;**3**:678–81.

- Dolin HH, Papadimos TJ, Stepkowski S *et al.* A Novel Combination of Biomarkers to Herald the Onset of Sepsis Prior to the Manifestation of Symptoms. *Shock Augusta Ga* 2018;**49**:364–70.
- Dorn A, Bollekens J, Staub A *et al.* A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell* 1987;**50**:863–72.
- Drewry AM, Samra N, Skrupky LP *et al.* Persistent Lymphopenia After Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality: *Shock* 2014;**42**:383–91.
- Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P *et al.* Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2013;**41**:820–32.
- Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol* 2017;**47**:765–79.
- Dziembowska M, Fondaneche MC, Vedrenne J *et al.* Three novel mutations of the CIITA gene in MHC class II-deficient patients with a severe immunodeficiency. *Immunogenetics* 2002;**53**:821–9.
- Eichacker PQ, Parent C, Kalil A *et al.* Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;**166**:1197–205.
- Eike MC, Skinningsrud B, Ronninger M *et al.* CIITA gene variants are associated with rheumatoid arthritis in Scandinavian populations. *Genes Immun* 2012;**13**:431–6.
- Evans L, Rhodes A, Alhazzani W *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 2021;**47**:1181–247.
- Fairfax BP, Humburg P, Makino S *et al.* Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression. *Science* 2014;**343**:1246949.
- Faivre V, Lukaszewicz A-C, Payen D. Downregulation of Blood Monocyte HLA-DR in ICU Patients Is Also Present in Bone Marrow Cells. *PLoS One* 2016;**11**:e0164489.

- Fang F, Zhang Y, Tang J *et al.* Association of Corticosteroid Treatment With Outcomes in Adult Patients With Sepsis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med* 2019;**179**:213–23.
- Faust HE, Reilly JP, Anderson BJ *et al.* Plasma Mitochondrial DNA Levels Are Associated With ARDS in Trauma and Sepsis Patients. *Chest* 2020;**157**:67–76.
- Ferreira da Mota NV, Brunialti MKC, Santos SS *et al.* Immunophenotyping of Monocytes During Human Sepsis Shows Impairment in Antigen Presentation: A Shift Toward Nonclassical Differentiation and Upregulation of FCyR1-Receptor. *Shock Augusta Ga* 2018;**50**:293–300.
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;**193**:259–72.
- Francois B, Jeannet R, Daix T *et al.* Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 2018;**3**:98960.
- Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;**166**:1475–82.
- Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;**340**:448–54.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;**9**:162–74.
- Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ *et al.* Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med* 2013;**41**:1167–74.
- Gatti A, Radrizzani D, Viganò P *et al.* Decrease of Non-Classical and Intermediate Monocyte Subsets in Severe Acute SARS-CoV-2 Infection. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2020;**97**:887–90.
- Georgescu AM, Banescu C, Azamfirei R *et al.* Evaluation of TNF- α genetic polymorphisms as predictors for sepsis susceptibility and progression. *BMC Infect Dis* 2020;**20**:221.

- Ghosh N, Piskurich JF, Wright G *et al.* A Novel Element and a TEF-2-like Element Activate the Major Histocompatibility Complex Class II Transactivator in B-lymphocytes. *J Biol Chem* 1999;**274**:32342–50.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N *et al.* Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe* 2020;**27**:992-1000.e3.
- Glatman Zaretsky A, Engiles JB, Hunter CA. Infection-induced changes in hematopoiesis. *J Immunol Baltim Md 1950* 2014;**192**:27–33.
- Gouel-Chéron A, Allaouchiche B, Floccard B *et al.* Early daily mHLA-DR monitoring predicts forthcoming sepsis in severe trauma patients. *Intensive Care Med* 2015;**41**:2229–30.
- Grazioli S, Pugin J. Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns: From Inflammatory Signaling to Human Diseases. *Front Immunol* 2018;**9**:832.
- Grimaldi D, Louis S, Pène F *et al.* Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2011;**37**:1438–46.
- Guérin E, Orabona M, Raquil M-A *et al.* Circulating Immature Granulocytes With T-Cell Killing Functions Predict Sepsis Deterioration*: *Crit Care Med* 2014;**42**:2007–18.
- Guignant C, Lepape A, Huang X *et al.* Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care Lond Engl* 2011;**15**:R99.
- Hall MW, Knatz NL, Vetterly C *et al.* Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 2011;**37**:525–32.
- Harrison P, Pointon JJ, Farrar C *et al.* MHC2TA promoter polymorphism (-168*G/A, rs3087456) is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in British Caucasian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Oxf Engl* 2007;**46**:409–11.
- Harton JA, Cressman DE, Chin KC *et al.* GTP binding by class II transactivator: role in nuclear import. *Science* 1999;**285**:1402–5.

- Holling TM, van der Stoep N, Quinten E *et al.* Activated human T cells accomplish MHC class II expression through T cell-specific occupation of class II transactivator promoter III. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002;**168**:763–70.
- Hornell TMC, Beresford GW, Bushey A *et al.* Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Baltim Md 1950* 2003;**171**:2374–83.
- Hotchkiss RS, Colston E, Yende S *et al.* Immune Checkpoint Inhibition in Sepsis: A Phase 1b Randomized, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose Study of Antiprogrammed Cell Death-Ligand 1 Antibody (BMS-936559). *Crit Care Med* 2019a;**47**:632–42.
- Hotchkiss RS, Colston E, Yende S *et al.* Immune checkpoint inhibition in sepsis: a Phase 1b randomized study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of nivolumab. *Intensive Care Med* 2019b;**45**:1360–71.
- Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE *et al.* The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med* 2009;**15**:496–7.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;**348**:138–50.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013a;**13**:862–74.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013b;**13**:260–8.
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006;**6**:813–22.
- Hu P, Chen Y, Pang J *et al.* Association between IL-6 polymorphisms and sepsis. *Innate Immun* 2019;**25**:465–72.
- Hwang CK, Kim CS, Kim DK *et al.* Up-regulation of the mu-opioid receptor gene is mediated through chromatin remodeling and transcriptional factors in differentiated neuronal cells. *Mol Pharmacol* 2010;**78**:58–68.

- International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 1991;**324**:509–16.
- Janols H, Bergenfelz C, Allaoui R *et al*. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol* 2014;**96**:685–93.
- Jarvis JN, Meintjes G, Rebe K *et al*. Adjunctive interferon- γ immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial. *AIDS Lond Engl* 2012;**26**:1105–13.
- Kaufmann SHE, Dorhoi A, Hotchkiss RS *et al*. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nat Rev Drug Discov* 2018;**17**:35–56.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;**11**:373–84.
- Kernan KF, Ghaloul-Gonzalez L, Shakoory B *et al*. Adults with septic shock and extreme hyperferritinemia exhibit pathogenic immune variation. *Genes Immun* 2019;**20**:520–6.
- Klein C, Lisowska-Grospierre B, LeDeist F *et al*. Major histocompatibility complex class II deficiency: clinical manifestations, immunologic features, and outcome. *J Pediatr* 1993;**123**:921–8.
- Koh GCKW, Peacock SJ, van der Poll T *et al*. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2012;**31**:379–88.
- Kong Y, Li Y, Zhang W *et al*. Sepsis-Induced Thymic Atrophy Is Associated with Defects in Early Lymphopoiesis. *Stem Cells Dayt Ohio* 2016;**34**:2902–15.
- Koonin EV, Aravind L. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci* 2000;**25**:223–4.
- Kretsovali A, Spilianakis C, Dimakopoulos A *et al*. Self-association of class II transactivator correlates with its intracellular localization and transactivation. *J Biol Chem* 2001;**276**:32191–7.

- Ku C-L, von Bernuth H, Picard C *et al.* Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4 deficient children: IRAK-4 dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 2007;**204**:2407–22.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006;**34**:1589–96.
- Kumar G, Kumar N, Taneja A *et al.* Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest* 2011;**140**:1223–31.
- Landelle C, Lepape A, Voirin N *et al.* Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 2010;**36**:1859–66.
- Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A *et al.* Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002;**18**:487–94.
- Leentjens J, Gresnigt MS, van de Veerdonk FL *et al.* Adjuvant interferon-gamma immunotherapy in a patient with progressive cerebral Nocardia abscesses. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 2017;**59**:25–8.
- Leentjens J, Kox M, Koch RM *et al.* Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;**186**:838–45.
- LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M, Krawczyk M *et al.* Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol* 2004a;**34**:1513–25.
- LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M, Reis e Sousa C *et al.* MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 2004b;**5**:899–908.
- León Machado JA, Steimle V. The MHC Class II Transactivator CIITA: Not (Quite) the Odd-One-Out Anymore among NLR Proteins. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:1074.
- Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P *et al.* Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: a multicenter,

- prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* 2009;**37**:1612-8.
- Liew FY, Xu D, Brint EK *et al.* Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005;**5**:446-58.
- Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD *et al.* Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 2008;**300**:413-22.
- Linhoff MW, Harton JA, Cressman DE *et al.* Two distinct domains within CIITA mediate self-association: involvement of the GTP-binding and leucine-rich repeat domains. *Mol Cell Biol* 2001;**21**:3001-11.
- Lohsen S, Majumder P, Scharer CD *et al.* Common distal elements orchestrate CIITA isoform-specific expression in multiple cell types. *Genes Immun* 2014;**15**:543-55.
- Lukaszewicz AC, Faivre V, Payen D. Is monocyte HLA-DR expression monitoring a useful tool to predict the risk of secondary infection? *Minerva Anesthesiol* 2010;**76**:737-43.
- Lukaszewicz A-C, Griénay M, Resche-Rigon M *et al.* Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 2009;**37**:2746-52.
- Luyt C-E, Combes A, Deback C *et al.* Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;**175**:935-42.
- Mach B, Steimle V, Reith W. MHC class II-deficient combined immunodeficiency: a disease of gene regulation. *Immunol Rev* 1994;**138**:207-21.
- Mahanta SK, Scholl T, Yang FC *et al.* Transactivation by CIITA, the type II bare lymphocyte syndrome-associated factor, requires participation of multiple regions of the TATA box binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:6324-9.
- Manjuck J, Saha DC, Astiz M *et al.* Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med* 2000;**135**:153-60.

- Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**:302–14.
- Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012;**10**:701–6.
- Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med* 2006;**34**:15–21.
- Masternak K, Muhlethaler-Mottet A, Villard J *et al.* CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* 2000;**14**:1156–66.
- Mathias B, Delmas AL, Ozrazgat-Baslanti T *et al.* Human Myeloid-derived Suppressor Cells are Associated With Chronic Immune Suppression After Severe Sepsis/Septic Shock. *Ann Surg* 2017;**265**:827–34.
- Meisel C, Schefold JC, Pschowski R *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;**180**:640–8.
- Meyer N, Harhay MO, Small DS *et al.* Temporal Trends in Incidence, Sepsis-Related Mortality, and Hospital-Based Acute Care After Sepsis. *Crit Care Med* 2018;**46**:354–60.
- Minneci PC, Deans KJ, Eichacker PQ *et al.* The effects of steroids during sepsis depend on dose and severity of illness: an updated meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2009;**15**:308–18.
- Mokart D, Textoris J, Chow-Chine L *et al.* HLA-DR and B7-2 (CD86) monocyte expressions after major cancer surgery: profile in sepsis. *Minerva Anesthesiol* 2011;**77**:522–7.
- Monneret G, Demaret J, Gossez M *et al.* Novel Approach in Monocyte Intracellular TNF Measurement: Application to Sepsis-Induced Immune Alterations. *Shock Augusta Ga* 2017;**47**:318–22.

- Monneret G, Finck M-E, Venet F *et al.* The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 2004;**95**:193–8.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N *et al.* Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006;**32**:1175–83.
- Monneret G, Venet F, Kullberg B-J *et al.* ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med Mycol* 2011;**49 Suppl 1**:S17-23.
- Moratto D, Chiarini M, Giustini V *et al.* Flow Cytometry Identifies Risk Factors and Dynamic Changes in Patients with COVID-19. *J Clin Immunol* 2020;**40**:970–3.
- Moreno CS, Beresford GW, Louis-Pence P *et al.* CREB regulates MHC class II expression in a CIITA-dependent manner. *Immunity* 1999;**10**:143–51.
- Muehlstedt SG, Lyte M, Rodriguez JL. Increased IL-10 production and HLA-DR suppression in the lungs of injured patients precede the development of nosocomial pneumonia. *Shock Augusta Ga* 2002;**17**:443–50.
- Muhlethaler-Mottet A, Otten LA, Steimle V *et al.* Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J* 1997;**16**:2851–60.
- Nahrendorf M. Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease. *Nat Med* 2018;**24**:711–20.
- Nakos G, Malamou-Mitsi VD, Lachana A *et al.* Immunoparalysis in patients with severe trauma and the effect of inhaled interferon-gamma. *Crit Care Med* 2002;**30**:1488–94.
- Nalos M, Santner-Nanan B, Parnell G *et al.* Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;**185**:110–2.
- Netzer C, Knappe T, Kuchler L *et al.* Apoptotic Diminution of Immature Single and Double Positive Thymocyte Subpopulations Contributes to Thymus Involution During Murine Polymicrobial Sepsis. *Shock Augusta Ga* 2017;**48**:215–26.

- Nguyen LS, Ait Hamou Z, Gastli N *et al.* Potential role for interferon gamma in the treatment of recurrent ventilator-acquired pneumonia in patients with COVID-19: a hypothesis. *Intensive Care Med* 2021;**47**:619–21.
- Ni Z, Abou El Hassan M, Xu Z *et al.* The chromatin-remodeling enzyme BRG1 coordinates CIITA induction through many interdependent distal enhancers. *Nat Immunol* 2008;**9**:785–93.
- Novotny AR, Reim D, Assfalg V *et al.* Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology* 2012;**217**:616–21.
- Nozell S, Ma Z, Wilson C *et al.* Class II major histocompatibility complex transactivator (CIITA) inhibits matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 2004;**279**:38577–89.
- Opal SM, Laterre P-F, Francois B *et al.* Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *Jama* 2013;**309**:1154–62.
- Ost M, Singh A, Peschel A *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;**6**:37.
- Otten LA, Steimle V, Bontron S *et al.* Quantitative control of MHC class II expression by the transactivator CIITA. *Eur J Immunol* 1998;**28**:473–8.
- Pachot A, Monneret G, Brion A *et al.* Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med* 2005a;**33**:31–8; discussion 236-237.
- Pachot A, Monneret G, Voirin N *et al.* Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin Immunol Orlando Fla* 2005b;**114**:61–9.
- Pan T, Liu Z, Yin J *et al.* Notch Signaling Pathway Was Involved in Regulating Programmed Cell Death 1 Expression during Sepsis-Induced Immunosuppression. *Mediators Inflamm* 2015;**2015**:539841.
- Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE *et al.* Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in

- patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med* 2004;**32**:2173–82.
- Patera AC, Drewry AM, Chang K *et al*. Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol* 2016;**100**:1239–54.
- Payen D, Faivre V, Miatello J *et al*. Multicentric experience with interferon gamma therapy in sepsis induced immunosuppression. A case series. *BMC Infect Dis* 2019;**19**:931.
- Peronnet E, Venet F, Maucort-Boulch D *et al*. Association between mRNA expression of CD74 and IL10 and risk of ICU-acquired infections: a multicenter cohort study. *Intensive Care Med* 2017;**43**:1013–20.
- Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M *et al*. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care* 2020;**24**:287.
- van der Poll T, Shankar-Hari M, Wiersinga WJ. The immunology of sepsis. *Immunity* 2021;**54**:2450–64.
- Poujol F, Monneret G, Pachot A *et al*. Altered T Lymphocyte Proliferation upon Lipopolysaccharide Challenge Ex Vivo. *PloS One* 2015;**10**:e0144375.
- Poynton CH, Barnes RA, Rees J. Interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for the treatment of hepatosplenic candidosis in patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1998;**26**:239–40.
- Prilutskiy A, Kritselis M, Shevtsov A *et al*. SARS-CoV-2 Infection-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Am J Clin Pathol* 2020;**154**:466–74.
- Pugin J, Heumann ID, Tomasz A *et al*. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994;**1**:509–16.
- Quintana-Murci L. Human Immunology through the Lens of Evolutionary Genetics. *Cell* 2019;**177**:184–99.

- Ramanujam R, Zhao Y, Pirskanen R *et al.* Lack of association of the CIITA -168A→G promoter SNP with myasthenia gravis and its role in autoimmunity. *BMC Med Genet* 2010;**11**:147.
- Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS *et al.* Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *N Engl J Med* 2012;**366**:2055–64.
- Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* 2012;**13**:333–332.
- Razaghi A, Owens L, Heimann K. Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. *J Biotechnol* 2016;**240**:48–60.
- Reinhart K, Daniels R, Kissoon N *et al.* Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *N Engl J Med* 2017;**377**:414–7.
- Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* 2005;**5**:793–806.
- Remy S, Gossez M, Belot A *et al.* Massive increase in monocyte HLA-DR expression can be used to discriminate between septic shock and hemophagocytic lymphohistiocytosis-induced shock. *Crit Care Lond Engl* 2018;**22**:213.
- Reyes M, Filbin MR, Bhattacharyya RP *et al.* Induction of a regulatory myeloid program in bacterial sepsis and severe COVID-19. *BioRxiv Prepr Serv Biol* 2020:2020.09.02.280180.
- Riddell LA, Pinching AJ, Hill S *et al.* A phase III study of recombinant human interferon gamma to prevent opportunistic infections in advanced HIV disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;**17**:789–97.
- Roquilly A, Villadangos JA. The role of dendritic cell alterations in susceptibility to hospital-acquired infections during critical-illness related immunosuppression. *Mol Immunol* 2015;**68**:120–3.
- Sacchi A, Grassi G, Bordoni V *et al.* Early expansion of myeloid-derived suppressor cells inhibits SARS-CoV-2 specific T-cell response and may predict fatal COVID-19 outcome. *Cell Death Dis* 2020;**11**:921.

- Sachini N, Papamatheakis J. NF- κ B and the immune response: Dissecting the complex regulation of MHC genes. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 2017;**1860**:537–42.
- Schaaf B, Luitjens K, Goldmann T *et al.* Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagn Pathol* 2009;**4**:12.
- Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H *et al.* Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;**168**:476–80.
- Schiff DE, Rae J, Martin TR *et al.* Increased phagocyte Fc gammaRI expression and improved Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon-gamma treatment of normal human subjects. *Blood* 1997;**90**:3187–94.
- Schnappauf F, Hake SB, Camacho Carvajal MM *et al.* N-terminal destruction signals lead to rapid degradation of the major histocompatibility complex class II transactivator CIITA. *Eur J Immunol* 2003;**33**:2337–47.
- Schrijver IT, Théroude C, Roger T. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis. *Front Immunol* 2019;**10**:327.
- Scozzi D, Ibrahim M, Liao F *et al.* Mitochondrial damage-associated molecular patterns released by lung transplants are associated with primary graft dysfunction. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2019;**19**:1464–77.
- Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW *et al.* Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Crit Care Med* 2016;**44**:275–81.
- Shankar-Hari M, Rubenfeld GD. Understanding Long-Term Outcomes Following Sepsis: Implications and Challenges. *Curr Infect Dis Rep* 2016;**18**:37.
- Shao R, Fang Y, Yu H *et al.* Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3-4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Crit Care Lond Engl* 2016;**20**:124.

- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R *et al.* The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007;**8**:239–45.
- Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G *et al.* Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell* 2020;**182**:1401-1418.e18.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;**315**:801–10.
- Sisk TJ, Roys S, Chang CH. Self-association of CIITA and its transactivation potential. *Mol Cell Biol* 2001;**21**:4919–28.
- Skinningsrud B, Husebye ES, Pearce SH *et al.* Polymorphisms in CLEC16A and CIITA at 16p13 are associated with primary adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:3310–7.
- Snyder A, Jedreski K, Fitch J *et al.* Transcriptomic Profiles in Children With Septic Shock With or Without Immunoparalysis. *Front Immunol* 2021;**12**:733834.
- Spilianakis C, Papamatheakis J, Kretsovali A. Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol* 2000;**20**:8489–98.
- Spinetti T, Hirzel C, Fux M *et al.* Reduced Monocytic Human Leukocyte Antigen-DR Expression Indicates Immunosuppression in Critically Ill COVID-19 Patients. *Anesth Analg* 2020;**131**:993–9.
- Sprung CL, Sakr Y, Vincent J-L *et al.* An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence In Acutely Ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med* 2006;**32**:421–7.
- Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A New Venue of TNF Targeting. *Int J Mol Sci* 2018;**19**:E1442.
- Steimle V, Otten LA, Zufferey M *et al.* Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 1993;**75**:135–46.

- Steimle V, Siegrist CA, Mottet A *et al.* Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994;**265**:106–9.
- Stuber F, Klaschik S, Lehmann LE *et al.* Cytokine promoter polymorphisms in severe sepsis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2005;**41 Suppl 7**:S416-420.
- Suffredini AF, Munford RS. Novel therapies for septic shock over the past 4 decades. *Jama* 2011;**306**:194–9.
- Swanberg M, Lidman O, Padyukov L *et al.* MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet* 2005;**37**:486–94.
- Sweeney TE, Wong HR. Risk Stratification and Prognosis in Sepsis: What Have We Learned from Microarrays? *Clin Chest Med* 2016;**37**:209–18.
- Takano K, Kaganoi J, Yamamoto K *et al.* Rapid and prominent up-regulation of high-affinity receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RI) by cross-linking of beta 2 integrins on polymorphonuclear leukocytes. *Int J Hematol* 2000;**72**:48–54.
- Thompson EA, Cascino K, Ordonez AA *et al.* Metabolic programs define dysfunctional immune responses in severe COVID-19 patients. *MedRxiv Prepr Serv Health Sci* 2020:2020.09.10.20186064.
- Tidswell M, Tillis W, LaRosa SP *et al.* Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a Toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis*: *Crit Care Med* 2010;**38**:72–83.
- Ting JP-Y, Davis BK. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* 2005;**23**:387–414.
- Ting JP-Y, Lovering RC, Alnemri ES *et al.* The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 2008;**28**:285–7.
- Ting JP-Y, Trowsdale J. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 2002;**109 Suppl**:S21-33.

- Ting JP-Y, Williams KL. The CATERPILLER family: an ancient family of immune/apoptotic proteins. *Clin Immunol Orlando Fla* 2005;**115**:33–7.
- Tissières P, Ochoda A, Dunn-Siegrist I *et al.* Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon- γ . *PloS One* 2012;**7**:e32863.
- Torgersen C, Moser P, Luckner G *et al.* Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg* 2009;**108**:1841–7.
- Tosi G, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Phosphorylation of CIITA directs its oligomerization, accumulation and increased activity on MHCII promoters. *EMBO J* 2002;**21**:5467–76.
- Tsujimoto H, Ono S, Majima T *et al.* NEUTROPHIL ELASTASE, MIP-2, AND TLR-4 EXPRESSION DURING HUMAN AND EXPERIMENTAL SEPSIS: *Shock* 2005;**23**:39–44.
- Uhel F, Azzaoui I, Grégoire M *et al.* Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;**196**:315–27.
- Vasseur E, Boniotto M, Patin E *et al.* The evolutionary landscape of cytosolic microbial sensors in humans. *Am J Hum Genet* 2012;**91**:27–37.
- Venet F, Demaret J, Blaise BJ *et al.* IL-7 Restores T Lymphocyte Immunometabolic Failure in Septic Shock Patients through mTOR Activation. *J Immunol Baltim Md 1950* 2017;**199**:1606–15.
- Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A *et al.* Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Crit Care Med* 2013a;**41**:111–9.
- Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D *et al.* Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 2013b;**25**:477–83.
- Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* 2018;**14**:121–37.

- Venet F, Tissot S, Debard AL *et al.* Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med* 2007;**35**:1910–7.
- Vogel TR. Update and review of racial disparities in sepsis. *Surg Infect* 2012;**13**:203–8.
- van Vught LA, Klein Klouwenberg PMC, Spitoni C *et al.* Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA* 2016;**315**:1469–79.
- Waeckel L, Venet F, Gossez M *et al.* Delayed persistence of elevated monocytic MDSC associates with deleterious outcomes in septic shock: a retrospective cohort study. *Crit Care Lond Engl* 2020;**24**:132.
- Waldburger J-M, Rossi S, Hollander GA *et al.* Promoter IV of the class II transactivator gene is essential for positive selection of CD4+ T cells. *Blood* 2003;**101**:3550–9.
- Waldburger JM, Suter T, Fontana A *et al.* Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med* 2001;**194**:393–406.
- Wang C, Gui Q, Zhang K. Functional polymorphisms in CD86 gene are associated with susceptibility to pneumonia-induced sepsis. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2015;**123**:433–8.
- Wang F, Hou H, Yao Y *et al.* Systemically comparing host immunity between survived and deceased COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 2020;**17**:875–7.
- Wang J, Roderiquez G, Jones T *et al.* Control of in vitro immune responses by regulatory oligodeoxynucleotides through inhibition of pIII promoter directed expression of MHC class II transactivator in human primary monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* 2007;**179**:45–52.
- Warren HS, Suffredini AF, Eichacker PQ *et al.* Risks and benefits of activated protein C treatment for severe sepsis. *N Engl J Med* 2002;**347**:1027–30.

- Weiss M, Fischer G, Barth E *et al.* Dissociation of LPS-induced monocytic ex vivo production of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and TNF-alpha in patients with septic shock. *Cytokine* 2001;**13**:51–4.
- Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011;**12**:492–9.
- Wiens MO, Kumbakumba E, Kissoon N *et al.* Pediatric sepsis in the developing world: challenges in defining sepsis and issues in post-discharge mortality. *Clin Epidemiol* 2012;**4**:319–25.
- Wu JF, Ma J, Chen J *et al.* Changes of monocyte human leukocyte antigen-DR expression as a reliable predictor of mortality in severe sepsis. *Crit Care* 2011;**15**:R220.
- Wu X, Kong X, Luchsinger L *et al.* Regulating the activity of class II transactivator by posttranslational modifications: exploring the possibilities. *Mol Cell Biol* 2009;**29**:5639–44.
- Xiao W, Mindrinos MN, Seok J *et al.* A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 2011;**208**:2581–90.
- Xue Y, Tang D, Li S-J *et al.* Link between CIITA rs3087456 polymorphism and the risk of laryngeal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Pathol Res Pract* 2020;**216**:152793.
- Yang Y, Yang KS, Hsann YM *et al.* The effect of comorbidity and age on hospital mortality and length of stay in patients with sepsis. *J Crit Care* 2010;**25**:398–405.
- Zhang Q, Raouf M, Chen Y *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;**464**:104–7.
- Ziegler EJ, Fisher CJ Jr, Sprung CL *et al.* Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1991;**324**:429–36.
- Zinzow-Kramer WM, Long AB, Youngblood BA *et al.* CIITA promoter I CARD-deficient mice express functional MHC class II genes in myeloid and lymphoid compartments. *Genes Immun* 2012;**13**:299–310.

Zorio V, Venet F, Delwarde B *et al.* Assessment of sepsis-induced immunosuppression at ICU discharge and 6 months after ICU discharge. *Ann Intensive Care* 2017;**7**:80.