



HAL
open science

Dysfonctions lymphocytaires et perturbations immuno-métaboliques au cours des états infectieux sévères

Florian Reizine

► **To cite this version:**

Florian Reizine. Dysfonctions lymphocytaires et perturbations immuno-métaboliques au cours des états infectieux sévères. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B024 . tel-03959243

HAL Id: tel-03959243

<https://theses.hal.science/tel-03959243>

Submitted on 27 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « *Immunologie* »

Par

Florian REIZINE

Dysfonctions lymphocytaires et perturbations immuno-métaboliques au cours des états infectieux sévères

Thèse présentée et soutenue à Rennes le 31 Mai 2022
Unité de recherche : U1236

Rapporteurs avant soutenance :

Julie HELMS
Guillaume MONNERET

Professeure, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Lyon

Composition du Jury :

Président : Karin TARTE
Examineurs : Lara ZAFRANI
Yves LE TULZO

Professeure, Université de Rennes 1
Professeure, Université de Paris
Professeur, Université de Rennes 1

Dir. de thèse : Jean-Marc TADIE

Professeur, Université de Rennes 1

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Marc TADIE pour avoir accepté de diriger cette thèse, je lui suis également reconnaissant pour sa créativité, son enthousiasme, le temps conséquent qu'il m'a accordé, ainsi que pour ses capacités d'encadrement.

A Madame la Professeure Karin TARTE pour avoir accepté de présider ce jury. Je la remercie également de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son implication, ses qualités scientifiques et son dynamisme ont grandement contribué à la réalisation des projets scientifiques qui constituent cette thèse.

A Madame la Professeure Julie HELMS pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

A Monsieur le Professeur Guillaume Monneret pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Madame la Professeure Lara ZAFRANI pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Monsieur le Professeur Yves LE TULZO pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse, ainsi que pour ses qualités humaines d'écoute et de compréhension.

A Murielle particulièrement pour son inestimable aide tout au long de ce travail ainsi qu'à toute l'équipe du SITI pour votre gentillesse et votre disponibilité. Sans vous ce travail n'aurait jamais pu être mené à bien.

Aux médecins, internes et équipes paramédicales du service de maladies infectieuses et réanimation médicale, pour votre accompagnement dans ma formation, votre dévouement est exemplaire.

A mes amis, ceux de toujours (les affreux : Simon, Thibault, Thomas, Charles et Bruno) qui malgré la distance sont et seront toujours présents, à ceux d'après (Myrtille, Léa, Valentin, Célia, Jessica, Chloé et leurs "valeurs ajoutées ©") qui m'ont fait grandir et qui me sont si chers. Ils sont tous ma fierté.

A mes camarades et amis de la faculté et plus récemment, les anesth... donc réa, du DESC du M2, du clinicat et d'ailleurs... Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de ces années. Les rencontrer a été une chance.

A Brigitte et Arnaud pour votre accueil, votre gentillesse et votre permanente bienveillance.

A mon frère et à ma sœur, Hugo et Julia, ainsi qu'à mes parents, pour leur soutien moral, matériel et leur confiance indéfectible dans mes choix. Sans eux, je n'en serais pas là aujourd'hui.

Enfin à Mathilde, pour son amour... À ses côtés, nous écrivons chaque jour les pages d'un livre qui ne cesse de s'embellir.

A Apolline et Anouk, les deux plus belles pages de mon existence.

Table des Matières

Table des matières	3
Table des illustrations	5
Liste des figures	6
Liste des tableaux.....	7
Liste des abréviations	8
Préambule	11
Introduction	13
Chapitre I. Infections et mécanismes de défense	13
1.1) Considérations physiologiques	13
1.2) Définitions du sepsis.....	13
1.3) Épidémiologie	15
1.4) Répercussions cliniques : Mortalité précoce et tardive	15
Chapitre II. Sepsis et choc septique	17
2.1) Les protagonistes infectieux	17
2.2) Les acteurs de la réponse immunitaire.....	20
2.3) Concept de “danger” et sepsis	25
Chapitre III. Sepsis et choc septique	28
3.1) Mécanismes cytokiniques du choc septique	28
3.2) Recrutement de nouveaux protagonistes : les cellules immunosuppressives.....	28
3.3) Principaux mécanismes de la lymphopénie	35
3.4) Immunodépression associée au sepsis et mortalité tardive	39
3.5) Implications cliniques.....	42
Chapitre IV. Sepsis et choc septique	48
4.1) Métabolisme de l'arginine et sepsis.....	48
4.2) Arginine et dysfonctions lymphocytaires	50

4.3) Fonctionnement mitochondrial et choc septique	52
Chapitre V. Modèles expérimentaux de sepsis et échecs des essais cliniques	53
5.1) Modèles animaux de sepsis	53
5.2) Limites des modèles	60
5.3) Immunonutrition : Déceptions thérapeutiques et arginine	61
Chapitre VI. Approches immunologiques des infections secondaires au SARS-COV2	64
6.1) COVID-19 et physiopathologie	64
6.2) Lymphopénie et COVID-19	66
6.3) MDSC au cours des infections graves à SARS-COV 2.....	67
6.4) Métabolisme de l'arginine	69
6.5) Infections acquises au cours du COVID-19.....	69
Objectifs	71
Résultats	73
Article 1.	73
Article 2.	94
Discussion	114
Conclusion et perspectives	121
Références bibliographiques	122
Annexes	134
Annexe 1.	135
Annexe 2.	138
Annexe 3.	155

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1. Dynamique de la mortalité au cours du sepsis.

Figure 2. Diversité des sous-types de lymphocytes T CD8.

Figure 3. Récepteurs cellulaires impliqués dans la reconnaissance des signaux de danger.

Figure 4. Mécanismes d'inhibition des fonctions lymphocytaires T par les MDSC.

Figure 5. Principaux mécanismes immunosuppresseurs médiés par les lymphocytes T régulateurs.

Figure 6. Conséquences de l'apoptose sur les fonctions immunitaires.

Figure 7. Dynamique de la réponse immunitaire et implications cliniques avant, pendant et après la survenue d'un sepsis.

Figure 8. Principaux organes surveillés au cours du sepsis.

Figure 9. Mortalité attribuable aux infections acquises en réanimation.

Figure 10. Principales voies impliquées dans le métabolisme de l'arginine.

Figure 11. Synthèse des effets immunosuppresseurs du déficit en arginine sur le fonctionnement lymphocytaire.

Figure 12. Modèle expérimental de Ponction Ligature Caecale.

Figure 13. Localisations anatomiques des ligatures caecales au cours de la CLP et impact sur la mortalité induite.

Figure 14. Physiopathologie des infections secondaires au SARS-CoV2.

Figure 15. Évaluation de la proportion de lymphocytes B spléniques CD39 positifs.

Figure 16. Evaluation de la clairance virale au cours du SDRA secondaire au SARS-CoV2.

Liste des tableaux

Tableau 1. Pathogènes responsables des infections chez les patients hospitalisés en réanimation.

Tableau 2. Localisation des infections chez les patients hospitalisés en réanimation.

Tableau 3. Score SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*).

Tableau 4. Score d'évaluation des lésions pulmonaires.

Liste des abréviations

A

ACE2 : Angiotensin converting enzyme 2
ADC : Arginine decarboxylases
AGAT : Arginine:glycine amidinotransferases
ALI : Acute lung injury
AMPc : Adénosine 3',5' monophosphate cyclique
AP1 : Activator protein 1
ArgRS : Arginyl-tRNA synthetase
ASL : Argininosuccinate lyase
ASS : Arginosuccinate synthetase
ATP : Adénosine triphosphate

B

b/min : Battements/minute
BCR : B-cell receptor
Bcl-2 : B-cell Lymphoma 2

C

c/min : Cycles/minute
CARS : Compensatory anti-inflammatory response syndrome
CASP : Colon Ascendens Stent Peritonitis
CD : Cluster de différenciation
CLP : Cecal Ligation and Puncture
CLR : C-type lectin receptors
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
COVID-19 : Coronavirus disease 2019
CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
CTLA4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CXCR2 : CX chemokine receptor 2

D

DAMPs : Damage associated molecular pattern

E

EM : Effector memory
EMRA : Effector memory cells re-expressing CD45RA

G

G-CSF : Granulocyte colony stimulating factor
G-MDSC : Granulocytic-MDSC
GM-CSF : Granulocyte Macrophage colony stimulating factor

I

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN : Interferon
IL : Interleukine
IRF : Interferon Regulatory Factor

L

LAG3 : Lymphocyte Activation Gene 3
LPS : Lipopolysaccharide

M

M-MDSC : Monocytic-MDSC
MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells
mmHg : Millimètres de mercure
MQTIPSS : Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies

N

NETs : Neutrophils Extracellular Traps
NF- κ B : Nuclear factor- κ B
NK : Natural Killer
NLR : Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
NO : Nitric Oxide
NOS : Nitric Oxide synthases

O

ODN : Oligodésoxynucléotides

P

PaCO₂ : Pression artérielle de dioxyde de carbone
PAMPs : Pathogen Associated Molecular Pattern
PAVM : Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique
PD-1 : Programmed cell death 1
PD-L1 : Programmed cell death ligand 1
PNN : Polynucléaires neutrophiles
PRR : Pattern recognition receptors

R

RAAS : Renin-Angiotensin-Aldosterone-System
RAGE : Receptor for advanced glycation end-products
RLR : Retinoic acid inducible gene 1-like receptors
ROS : Reactive oxygen species

S

SARS-CoV 2 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique
SOFA : Sequential Organ Failure Assessment

T

Tcm : Central memory T cells
TCR : T-cell receptor
TGF- β : Transforming growth factor β

TIM3 : T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3
TLR : Toll-like Receptors
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
Treg : Lymphocytes T régulateurs
Trm : Tissue-resident memory T cells
Tsmc : Stem cell like memory T cells

Préambule

L'histoire de l'humanité est marquée par la survenue de maladies infectieuses dont les conséquences sont à l'origine de grands bouleversements de nos civilisations. Depuis la peste noire à la fin de la période médiévale (ayant entraîné de profonds changements démographiques et sociaux qui préludent à la Renaissance), les évolutions de nos civilisations ont souvent été guidées par les différentes pandémies. L'ère de la médecine hippocratique en Grèce antique vit apparaître les premières descriptions et le concept de sepsis issu du mot grec "sepo", (σηπω) signifiant une décomposition, un délabrement, une putréfaction des tissus¹. Au-delà des constatations initiales, la théorisation des mécanismes aboutissant à ce phénomène fut initiée par Aulus Cornelius Celsus (25 av. J.-C.-50) et Claude Galien (129-200) qui décrivent les signes d'inflammation (vasodilatation périphérique (rubor), fièvre (calor), douleur (dolor), augmentation de la perméabilité capillaire (tumor) et dysfonctionnements des organes (functio laesa))². Ces premières théories ont fondé la pratique de la médecine jusqu'au XIX^{ème} siècle. Sous l'impulsion de Louis Pasteur (1822-1895), la création de la "théorie microbienne" permit un changement de paradigme dans la compréhension des maladies infectieuses, théorisant la responsabilité d'un agent pathogène comme origine du sepsis et conduisant à une infection systémique.

De ces révolutions scientifiques ont émergé de nombreux concepts permettant aujourd'hui d'appréhender les infections comme une réaction inflammatoire faisant intervenir le système immunitaire contre un pathogène afin d'assurer la survie du malade. Néanmoins, si l'ampleur des réactions déclenchées est trop importante, la réponse immunitaire peut contribuer aux diverses lésions tissulaires et cellulaires participant aux défaillances des organes vitaux. Le contrôle de la réaction inflammatoire, permettant un retour rapide à l'état d'équilibre antérieur également défini comme homéostasie, fait toute la complexité du sepsis. Afin de limiter ces lésions, des mécanismes anti-inflammatoires vont ainsi concomitamment être mis en œuvre. Ces réactions contribuent au développement d'un état d'immunodépression post-septique dont les conséquences comprennent en premier lieu la survenue d'infections secondaires. Vouloir décrire tous les mécanismes impliqués dans l'immunodépression et la dysfonction d'organes qui font toute la gravité du sepsis

serait fastidieux. Au cours de cette introduction, nous approfondirons deux phénomènes qui nous semblent fondamentaux et que nous avons particulièrement étudié lors de ce travail de thèse :

1. Les mécanismes à l'origine d'une dysfonction lymphocytaire
2. L'atteinte pulmonaire liée au sepsis.

Ainsi, ce travail de thèse intitulé **“Dysfonctions lymphocytaires et perturbations immuno-métaboliques au cours des états infectieux sévères”** s'articule en 2 axes :

Le premier s'appuie sur des travaux expérimentaux comprenant le développement d'un modèle animal de sepsis. Dans un premier temps, certains mécanismes immunosuppresseurs mis en œuvre au cours du sepsis ont été objectivés. Ces mécanismes impliquent notamment des populations cellulaires immunosuppressives (cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-Derived Suppressor Cells ou MDSC), lymphocytes T régulateurs) ainsi que la survenue de perturbations du métabolisme de l'arginine et de la respiration mitochondriale des lymphocytes T. D'autre part, ce modèle murin a permis la mise en évidence des conséquences du sepsis (notamment la survenue de lésions du parenchyme pulmonaire) ainsi que l'exacerbation de la susceptibilité à seconde agression infectieuse. Enfin les perspectives thérapeutiques suggérées par le déficit en arginine constaté ont pu être testées. La correction de ce déficit grâce à une supplémentation en citrulline (précurseur de l'arginine) a permis de limiter les conséquences d'une première agression septique sur ce modèle animal.

Dans un second temps, la survenue de la pandémie secondaire aux infections à SARS-CoV 2 et les caractéristiques biologiques des patients atteints de formes sévères de COVID-19 comprenant la présence d'une lymphopénie profonde, semblable à celle observée au cours du sepsis bactérien, a motivé la réalisation d'un travail translationnel. Nous avons ainsi envisagé d'effectuer une caractérisation de ce phénomène ainsi qu'une exploration des mécanismes imputés dans un second axe de recherche. Ce travail ayant abouti à la réalisation d'un essai thérapeutique.

Introduction

Chapitre I. Infections et mécanismes de défense

1.1) Considérations physiologiques

L'infection peut être définie par les événements cliniques et biologiques entraînés par la rencontre d'un pathogène étranger avec l'organisme. La myriade de réactions biologiques survenant à la suite de cette rencontre va conditionner la dissémination systémique de ce pathogène ou son éradication. Afin de contenir localement l'infection, ce pathogène devra être reconnu par le système immunitaire de l'hôte. Un large panel de réactions immunologiques va alors survenir. La traduction clinique de ces réactions comporte la survenue de symptômes divers dont l'ampleur permet de déterminer la sévérité de l'infection. Lorsque cette infection est accompagnée de signes cliniques graves et/ou perturbations biologiques, celle-ci est alors dénommée sepsis ou choc septique selon la sévérité des symptômes.

1.2) Définitions du sepsis

La définition couramment admise du sepsis est celle d'un syndrome inflammatoire généralisé secondaire à une infection³, cette définition élémentaire était initialement également associée à une classification fondée sur la sévérité comprenant 4 stades : le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique.

Le SIRS était défini par la présence d'au moins 2 critères parmi :

- la Température > 38,3 °C ou < 36 °C
- la Fréquence cardiaque > 90 b/min
- la Fréquence respiratoire > 20 c/min ou PaCO₂ < 32 mmHg
- la Leucocytose > 12 000 ou < 4000/mm³ ou > 10 % de formes immatures

Le sepsis était alors défini par l'association de deux critères de SIRS et d'une infection présumée ou confirmée. Le sepsis sévère quant à lui répondait à la définition d'un sepsis compliqué d'une défaillance d'organe (pulmonaire, rénale, hépatique, hématologique et/ou neurologique). Enfin lorsque ce sepsis sévère était compliqué d'une hypotension artérielle réfractaire, celui-ci devait être considéré comme un état de choc septique.

Bien que retranscrivant difficilement l'hétérogénéité des syndromes infectieux (spécificités des sites infectés ou des agents pathogènes etc...), cette définition permit l'introduction du concept de SIRS. La survenue d'un SIRS reflète l'importance de l'infection, échappant à une éradication locale de l'agent pathogène dont les conséquences se traduisent par des dysfonctions d'organes. Au-delà de la pertinence clinique discutable de cette définition, celle-ci permet également une standardisation diagnostique et thérapeutique constituant ainsi un outil scientifique sur lequel s'appuyer dans le cadre d'études axées sur le sepsis.

Les évaluations de ces définitions ont néanmoins rapporté l'imparfaite précision des critères utilisés responsable d'une sensibilité⁴ et d'une spécificité médiocres quant à l'origine infectieuse de l'affection chez de nombreux patients⁵. Les faiblesses soulignées ont contribué à la constitution de nouvelles sociétés savantes et à l'élaboration de nouvelles définitions dont les objectifs comprennent de meilleures performances diagnostiques, une reproductibilité tout en gardant une pertinence, un pragmatisme et une simplicité clinique afin de faciliter leur mise en œuvre⁶.

La dernière définition issue du consortium international intitulé "SEPSIS-3" épouse une description phénotypique de cette pathologie, le sepsis y étant défini comme une dysfonction de la réponse de l'hôte face à une infection responsable d'une défaillance d'organe mettant en jeu le pronostic vital⁷.

1.3) Épidémiologie

La dernière estimation révélait une incidence mondiale de l'ordre de 48,9 millions/an⁸. D'autre part, de récentes études épidémiologiques estiment que les états septiques graves représentent l'une des principales causes d'hospitalisation en réanimation (de l'ordre de 10 à 20% des hospitalisations)^{9,10}.

S'il est délicat d'évaluer l'incidence du sepsis, l'estimation des conséquences de cette pathologie sur le pronostic des patients se révèle être une tâche encore plus ardue tant les facteurs de confusion sont nombreux. La mortalité attribuable au sepsis s'élevait à 11 millions de personnes en 2017, représentant la cause principale de décès à l'hôpital¹¹, alors que 20% de tous les décès à travers le monde survenaient au décours d'une pathologie infectieuse⁸.

1.4) Répercussions cliniques : Mortalité précoce et tardive

L'étude de la dynamique de la mortalité attribuable au sepsis révèle une temporalité particulière comportant une mortalité précoce qui n'a cessé de diminuer au cours des dernières décennies⁹. Cette diminution de la mortalité précoce a cependant démasqué l'importance d'une morbi-mortalité tardive dont la survenue d'infections secondaires est la clé de voûte^{12,13} (Figure 1). Ce surrisque d'infections secondaires a amené les cliniciens et scientifiques à se questionner quant aux mécanismes imputables, et les premières pistes évoquées ont rapidement permis d'incriminer la survenue de dysfonctions immunitaires protéiformes dont l'exploration permet d'entrevoir les prémices d'une nouvelle révolution médicale.

Nous étudierons les mécanismes à l'origine de cette mortalité tardive liée à une susceptibilité accrue aux infections secondaires et à la persistance de dysfonctions d'organes.

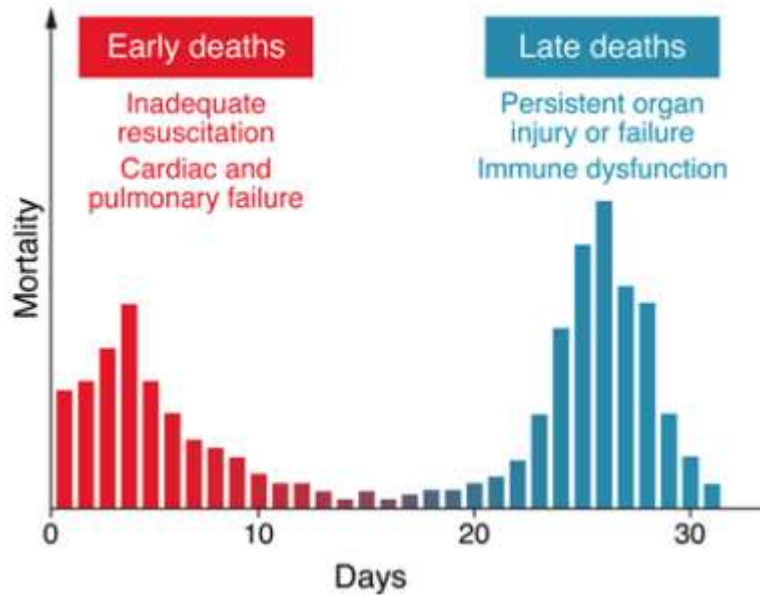


Figure 1. Dynamique de la mortalité au cours du sepsis.
D'après Delano et al. ¹³.

Cette dynamique est caractérisée par un pic de mortalité précoce essentiellement attribuable aux dysfonctions d'organes causées par la propagation de l'agent infectieux responsable d'une réponse immunitaire initiale exacerbée. Le second pic de mortalité survient plus tardivement. Ses origines sont attribuées à la persistance des dysfonctions d'organes dont les dysfonctions immunitaires favorisent la survenue d'infections acquises.

Chapitre II. Sepsis et choc septique

2.1) Les protagonistes infectieux

Différents agents pathogènes peuvent être responsables d'un sepsis. La diversité de ces pathogènes est un élément essentiel influençant le pronostic des patients. Déterminer le pathogène causal d'un sepsis est un enjeu crucial puisqu'il conditionnera l'utilisation d'un traitement anti-infectieux efficace. Les principaux types de pathogènes sont bactériens, viraux fongiques ou encore parasitaires (Table 1).

Principaux pathogènes responsables de sepsis en réanimation	
Bactéries à Gram positif	37%
Bactéries à Gram négatif	67.3%
Bactéries anaérobies	3.5%
Autres bactéries	1.7%
Champignons	16.4%
Virus	3.7%
Parasites	0.8%
Flore mixte	1.7%

Tableau 1. Pathogènes responsables des infections chez les patients hospitalisés en réanimation. D'après Vincent et *al.* ¹⁴.

Infections bactériennes

Les infections dues à ces protagonistes représentent la première cause d'infections à travers le monde¹⁵. Bien que les études les plus récentes aient suggéré une incidence croissante d'organismes à Gram positif (probablement en raison d'une plus grande utilisation des procédures invasives et de la proportion croissante d'infections nosocomiales), la dernière étude européenne évaluant la prévalence des infections en soins intensifs (EPIC III) a objectivé la persistance d'une plus importante

prévalence de bactéries à Gram négatif (67.3 % contre 37 %) ¹⁴. Au cours de cette étude les principaux sites des infections étaient également détaillés (Table 1). La localisation anatomique de l'origine du sepsis doit être considérée tant en raison des pathogènes impliqués que de son influence sur le pronostic des patients ¹⁶.

Site de l'infection	
Pulmonaire	60.1%
Abdominal	18.3%
Bactériémie	15.2%
Génito-urinaire	10.8%
Système nerveux central	3.9%
Rénal	3.2%
Liée à un cathéter	3.1%
Autre	6.5%

Tableau 2. Localisations des infections chez les patients hospitalisés en réanimation. D'après JL Vincent et al. ¹⁴

Infections virales

Avant la survenue de la pandémie secondaire au SARS-CoV2¹⁷, les études épidémiologiques rapportaient environ 1% des cas de sepsis comme attribuables à une origine virale¹⁸⁻²⁰. Cependant, ce chiffre sous-estimait probablement la prévalence des sepsis viraux pour plusieurs raisons²¹. Tout d'abord la majorité des études épidémiologiques sur le sepsis excluait jusqu'à présent les cas d'origine virale ou ne précisait pas la proportion de ces étiologies. D'autre part, ces études ont essentiellement été conduites dans des régions géographiques comportant assez peu d'épidémies virales responsables de sepsis. Ainsi, une étude récente menée dans le sud-est asiatique objectivait des proportions grandement plus élevées de

sepsis d'origine virale. Ces infections virales représentaient, respectivement, 76% et 33% en pédiatrie et chez l'adulte²².

Enfin, ce sous-diagnostic des infections virales est également lié aux outils permettant l'identification des pathogènes viraux qui n'étaient que peu répandus jusqu'à présent.

Infections parasitaires et fongiques

Parmi les agents infectieux responsables de sepsis, le paludisme domine largement les étiologies parasitaires. Selon le dernier rapport mondial sur le paludisme, il y a eu 229 millions de cas de paludisme en 2019²³. D'autres parasitoses peuvent être responsables de sepsis (leishmanioses, toxoplasmoses, trypanosomiasés...) dont l'incidence mondiale est plus faible et surtout concentrée dans certaines zones géographiques (Afrique et Amérique du sud) ou survenant particulièrement chez des patients immunodéprimés (toxoplasmose).

Les pathogènes fongiques quant à eux représentent entre 6 et 20% de l'ensemble des états septiques selon certaines estimations^{15,24,25}. En tant qu'entité nosologique, les infections sanguines à *Candida* (candidémies) sont l'une des infections sanguines associées aux soins de santé les plus courantes²⁴ et sont associées à une mortalité élevée²⁶.

2.2) Les acteurs de la réponse immunitaire

Réponse innée

La réponse inflammatoire innée comprend l'ensemble des mécanismes de défense n'impliquant pas une reconnaissance spécifique de l'agent pathogène impliqué. Les réactions mises en œuvre au cours de cette phase de la réponse immunitaire sont constituées de facteurs cellulaires (polynucléaires neutrophiles (PNN), macrophages/monocytes, lymphocytes Natural Killer (NK)) ainsi que de facteurs humoraux (activation du complément, défensines et collectines).

Les polynucléaires neutrophiles

Ces cellules, caractérisées par la présence de granules intra cytoplasmiques, vont particulièrement contribuer à cette réponse inflammatoire précoce grâce à diverses propriétés. La phagocytose permet notamment de détruire les pathogènes mais aussi de présenter aux lymphocytes T les antigènes permettant ultérieurement la réponse adaptative. Les PNN ont également des effets microbicides par le biais d'une sécrétion et d'une exocytose de médiateurs cytotoxiques tels que la myeloperoxydase, les ROS (reactive oxygen species ou espèces réactives de l'oxygène), les défensines, les perforines et les granzymes^{27,28}. Enfin ces cellules vont entraîner la formation de NETs (Neutrophils Extracellular Traps) qui sont constitués de fibres extracellulaires d'ADN agissant en piégeant puis en détruisant certains microorganismes²⁹.

Les macrophages/monocytes

Ces cellules myéloïdes ont également un rôle essentiel au sein de la réponse anti-infectieuse grâce à leurs propriétés phagocytaires et à leurs capacités de sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines, les chimiokines, le monoxyde d'azote (ou Nitric Oxide: NO) et la production de radicaux libres³⁰. Il existe plusieurs sous-populations monocytaires dont la polarisation est médiée par le milieu dans lequel elles se trouvent. Cette polarisation pourra orienter le type de

réponse inflammatoire exercée par ces cellules³¹. Localement les monocytes se différencient en macrophages et cellules dendritiques. Ces cellules contribuent également à la réponse adaptative par leur fonction de présentation des antigènes aux lymphocytes.

D'autres acteurs cellulaires de la réponse immunitaire innée jouent parfois un rôle prépondérant tels que les NK ou encore les polynucléaires éosinophiles qui peuvent, tous deux, avoir des effets cytotoxiques sur les cellules infectées ou encore exercer des fonctions de présentation antigénique³²⁻³⁴.

Les facteurs humoraux de la réponse innée

La réponse innée est également constituée de facteurs solubles comprenant le système du complément. L'activation du complément (favorisant la génération des anaphylatoxines C3a et C5a, C4a et le complexe membrane-attaque) va faciliter la phagocytose des pathogènes (opsonisation) ainsi que la destruction des cellules infectées par interaction moléculaire en induisant des lésions cellulaires (complexe d'attaque membranaire). Par ailleurs, l'activation du complément va favoriser la libération de granzymes et la production ROS par les PNN^{35,36}.

Réponse adaptative

Cette phase de la réponse anti-infectieuse est orchestrée par les lymphocytes. Les 2 principaux types lymphocytaires sont les lymphocytes T, dont le marqueur spécifique est le TCR (T-cell receptor), et les lymphocytes B caractérisés par leur capacité à se différencier en plasmocytes permettant la réponse humorale (production d'anticorps).

Lymphocytes T

Les lymphocytes T, dont les 2 populations sont les lymphocytes T auxiliaires (CD4) ou cytotoxiques (CD8), ont un rôle essentiel au cours du sepsis bien que plus tardivement mis en jeu. L'activation des lymphocytes T survient grâce à une

interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les TCR par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) formant la synapse immunologique. Cette interaction permet la différenciation du lymphocyte T naïf en cellule effectrice ainsi qu'une prolifération lymphocytaire (expansion clonale) avec spécificité antigénique. La maturation lymphocytaire leur permet alors de jouer pleinement un rôle d'orchestration de la réponse immunitaire à la croisée des chemins entre immunités cellulaire et humorale, immunités innée et adaptative. Le nombre et la durée de vie de ces cellules sont issus d'un équilibre entre la prolifération lymphocytaire (génération de nouvelles cellules et croissance de la population cellulaire) et la mort cellulaire dont les 2 principaux types sont la nécrose et l'apoptose lymphocytaire.

A la différenciation des lymphocytes T effecteurs s'associe une activation de ces cellules permettant d'entraîner la clairance du pathogène. Les rôles joués par les lymphocytes T CD4 comportent une interaction avec les lymphocytes T CD8 (cytotoxiques) permettant d'assurer la formation de CD8 fonctionnels.

La différenciation lymphocytaire participe à la constitution d'un panel de cellules, des lymphocytes T naïfs (ayant la capacité de répondre aux nouveaux antigènes) aux cellules mémoires ou effectrices, permettant de moduler la réponse immunitaire contre les agents pathogènes. Les cellules effectrices sont caractérisées par une courte durée de vie alors que les cellules mémoires ont un potentiel de survie plus important permettant une expansion rapide et une activité majorée en cas de nouvelle exposition au même pathogène³⁷. Au-delà de cette dichotomie, il existe une hétérogénéité au sein même des populations mémoires et effectrices (Figure 2). Les différents panels lymphocytaires issus de cette hétérogénéité sont caractérisés par des localisations (sang, rate, ganglions lymphatiques, moelle osseuse...), des fonctions et des phénotypes différents³⁸⁻⁴⁰. L'environnement cytokinique et l'intensité des signaux induits par le TCR vont influencer la différenciation des lymphocytes T mémoires en 4 sous-types :

- Les cellules souches mémoires "classiques" capables d'auto renouvellement. Ces cellules multipotentes constituent un réservoir de cellules T rapidement mobilisables en cas de nouvelle agression.

- Les cellules centrales mémoires, essentiellement localisées dans les ganglions lymphatiques et dotées d'importantes capacités de proliférations et de production d'Interleukine (IL)-2.

- Les cellules effectrices mémoires (EM), dont deux sous-populations sont décrites. EM classiques et EM exprimant le CD45RA (EMRA), plus matures et activées. Ces cellules, incapables de proliférer, sont caractérisées par une capacité de migration vers les tissus où elles participent essentiellement à la production cytokinique. Les lymphocytes T CD8 EM et EMRA ont également une forte capacité cytotoxique immédiate⁴¹.

- Les lymphocytes T résidents mémoires (Trm) uniquement localisés dans les tissus et caractérisés par une longue durée de vie.

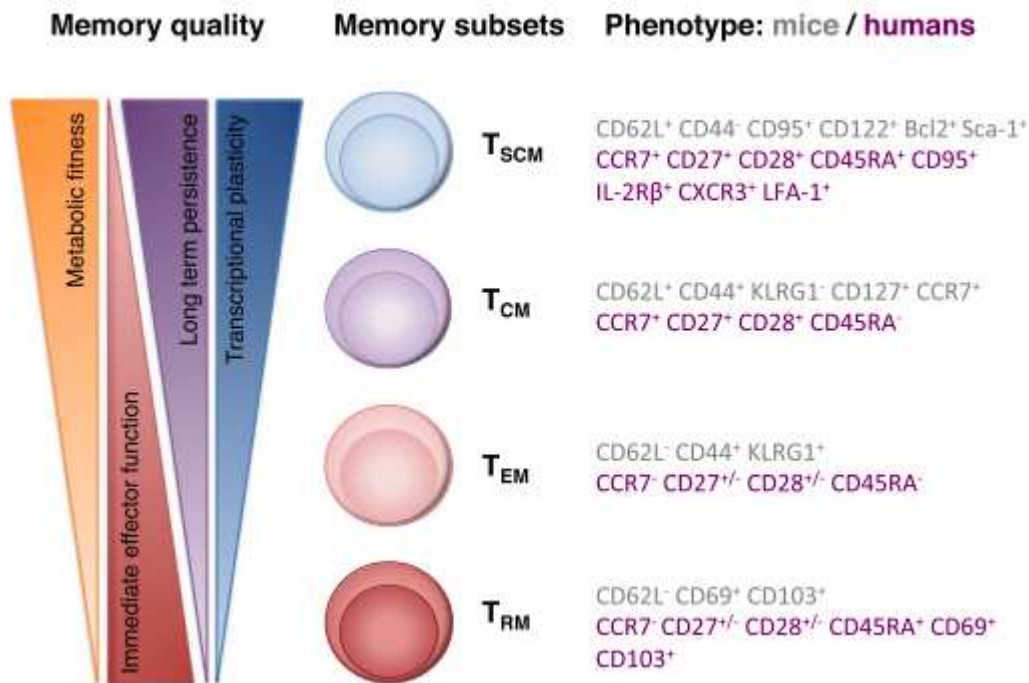


Figure 2. Diversité des sous-types de lymphocytes T CD8.
D'après Jandus C et al.³⁹

Caractérisation des 4 principaux sous-types de lymphocytes T CD8 mémoires selon leurs fonctions et leur phénotype chez la souris et l'humain. Tsmc: stem cell like memory T-cells; Tcm: central memory T-cells; Tem: effector memory T-cells; Trm: tissue resident T-cells.

Les lymphocytes peuvent également se différencier en lymphocytes T, régulateurs essentiels au maintien de la tolérance périphérique, à la prévention de l'auto-immunité, de la survenue de maladies inflammatoires chroniques et dans le contexte d'une infection, limitant l'activation des cellules immunitaires⁴².

Enfin, les lymphocytes T orientent également la réponse immunitaire grâce à leur capacité de synthèse cytokinique, comportant notamment la production d'interféron (IFN)- γ , d'IL-17, de Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , et de Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) qui peut favoriser la destruction du microorganisme causal en stimulant la phagocytose.

Lymphocytes B

Les lymphocytes B, caractérisés par la présence à leur surface du BCR (B cell receptor), forment une population cellulaire hétérogène dotée de différentes propriétés fonctionnelles et phénotypiques. Les fonctions des lymphocytes B comportent l'activation des lymphocytes T⁴³, une fonction de synthèse cytokinique participant à la génération de la cascade cytokinique⁴⁴ et sont les protagonistes de la réponse humorale par la production d'anticorps permettant de faciliter la phagocytose (opsonisation) et l'activation de la voie du complément. Par ailleurs, il existe un contingent de lymphocytes B aux propriétés anti-inflammatoires qualifiés alors de lymphocytes B régulateurs. Ces cellules, caractérisées par une capacité de production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 essentiellement), ont initialement été décrites au cours de maladies auto-immunes⁴⁵.

L'interaction entre les pathogènes impliqués et certains récepteurs de ces populations cellulaires permet l'initiation de la réponse anti-infectieuse.

2.3) Concept de “danger” et sepsis

La genèse de la réponse inflammatoire au cours d'une infection est attribuée à la détection moléculaire d'une agression. Des médiateurs moléculaires sont en effet libérés au cours des lésions tissulaires, qu'importe l'origine de ces lésions (sepsis, évidemment mais aussi traumatismes, brûlures ou encore ischémie et nécrose).

Lorsque ces signaux ont une origine endogène ils sont appelés DAMPs (Damage associated molecular pattern)²⁹.

Lorsque les signaux de danger proviennent d'un organisme biologique, ils sont appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern). Les exemples de PAMPs comprennent le lipopolysaccharide (LPS, composant de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif), l'acide lipotéichoïque, le peptidoglycane, les lipopeptides, les Receptor for advanced glycation end products (RAGE) ou encore les ADN viraux⁴⁶. La détection de ces signaux de danger fait intervenir des récepteurs de reconnaissance des pathogènes nommés PRR (Pattern Recognition Receptors).

Ces PRR reconnaissent une grande variété de pathogènes grâce à une diversité de localisation (solubles, membranaires ou encore cytoplasmiques) et de structures. Il existe 4 grandes classes de PRR : les Toll Like Receptors (TLR), les Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLR), les C-type lectin receptors (CLR) et les Retinoic acid inducible gene 1-like receptors (RLR). DAMPs et PAMPs seront reconnus, selon leur nature, par les différents PRR. L'interaction PRR-PAMPs ou PRR-DAMPs entrainera alors l'activation de diverses voies de signalisation, contribuant au recrutement et à l'activation des cellules immunitaires (**Figure 3**).

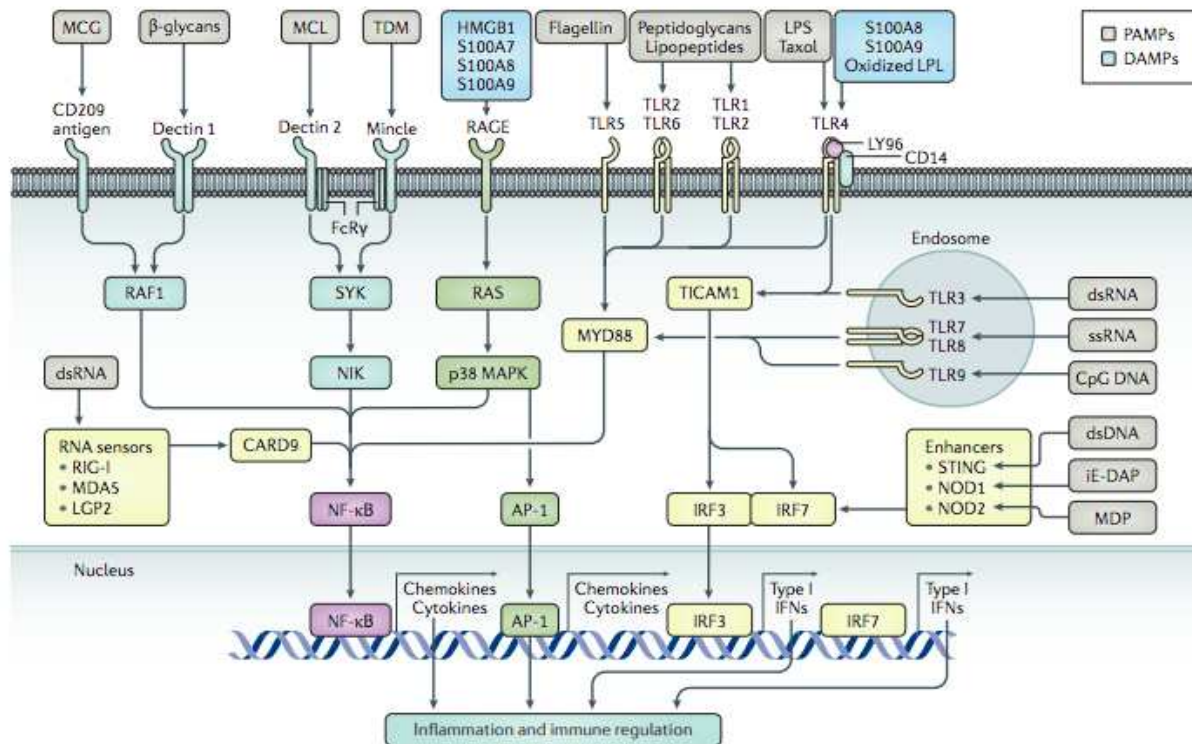


Figure 3. Récepteurs cellulaires impliqués dans la reconnaissance des signaux de danger. D'après Hotchkiss et al.⁴⁷.

La reconnaissance par les cellules de l'hôte de PAMPs et de DAMPs est caractérisée par une activation des voies de signalisation de l'inflammation. Cette reconnaissance fait intervenir divers récepteurs cellulaires et intracellulaires illustrés ici (TLR, RAGE, RNA sensors...). Les voies de signalisation résultant de cette interaction convergent généralement vers l'activation de l'IRF (Interferon Regulatory Factor) (qui favorise la production d'IFN) de l'AP1 (activator protein 1) et de la voie NF- κ B (nuclear factor- κ B) toutes deux responsables de l'activation précoce des gènes de l'inflammation (tels que ceux du TNF, de l'IL-1...).

Les infections les plus sévères (choc septique) entraînent une dérégulation de la réponse inflammatoire dont les conséquences comportent la survenue de perturbations du système immunitaire et de dysfonctions d'organes. Nous allons les décrire dans une troisième partie. Tout d'abord la réponse cytokinique responsable d'une dysfonction immunitaire (nouveaux acteurs, altération des autres acteurs) puis nous décrivons les répercussions cliniques (choc, atteintes des autres organes et survenue d'infections secondaires).

Chapitre III. De l'homéostasie au déséquilibre

3.1) Mécanismes cytokiniques du choc septique

Les cytokines, ces messagers intercellulaires, sont de petits médiateurs protéiques dont la production est régulée par l'activation initiale des premiers acteurs de la réponse inflammatoire innée peu après la détection des agents pathogènes. Ces médiateurs peptidiques sont dotés de fonctions biologiques pléiotropes comprenant non seulement une activité anti-infectieuse propre mais aussi la capacité de recruter, d'activer et de faire migrer les cellules de l'immunité. L'interaction entre PAMPs (ou DAMPs) et PRR est responsable de l'activation de facteurs de transcription aboutissant à la synthèse précoce des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 ainsi que les interférons⁴⁷. Celles-ci vont à leur tour renforcer l'état d'activation des cellules immunitaires de l'organisme entraînant elle-même la production de ces médiateurs. D'autre part, l'analyse du profil cytokinique de patients atteints de choc septique a révélé l'existence d'une production majorée de médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10⁴⁸. Cet environnement cytokinique anti-inflammatoire est non seulement le témoin de l'activation de cellules immunosuppressives mais participe également à la survenue de dysfonctions des cellules de l'inflammation.

3.2) Recrutement de nouveaux protagonistes : les cellules immunosuppressives

Myeloid-Derived suppressor cells (MDSC)

Ce contingent cellulaire découvert au cours des années 1970 a suscité un intérêt croissant au cours des dernières décennies. Initialement décrites au cours de néoplasies⁴⁹, ces cellules dont l'origine est myéloïde, sont principalement caractérisées par leurs fonctions immunosuppressives. Chez les individus sains il existe une quantité infime de ces cellules, alors que chez les patients soumis à une agression (qu'elle soit tumorale, traumatique ou encore septique), le recrutement de ces cellules devient manifeste^{50,51}.

Les descriptions phénotypiques de cellules murines, en cytométrie de flux, ont permis une subdivision des MDSC en deux sous populations selon l'expression de certains marqueurs de différenciation⁵²:

- Les M-MDSC pour Monocytic-MDSC issus des progéniteurs monocytaires définies comme étant CD11b⁺ Ly6G^{low} Ly6C⁺ chez la souris.

- Les G-MDSC pour Granulocytic-MDSC issus des progéniteurs granulocytaires comme étant CD11b⁺ Ly6G⁺ et Ly6C⁻ chez la souris et ayant une morphologie proche des granulocytes.

Les principales théories de l'origine des MDSC comprennent :

- La myélopoïèse d'urgence en réponse à l'inflammation, sous l'action de Granulocyte-Colony stimulating factor (G-CSF) et de Granulocyte Macrophage- CSF (GM-CSF), responsable de la migration de cellules immatures dans le sang périphérique où elles acquièrent leurs fonctions immunosuppressives⁵³.

- La reprogrammation ou dédifférenciation de cellules matures (monocytes pour les Monocytic-MDSC (M-MDSC)) secondaires à une stimulation répétée des TLR.

- L'activation des PNN en MDSC polymorphonucléaires (PMN-MDSC) sous l'influence du microenvironnement inflammatoire aboutissant à la formation de Granulocytic-MDSC (G-MDSC).

Ces cellules sont caractérisées par des fonctions immunosuppressives initialement découvertes dans le cadre de mécanismes visant à soutenir la croissance tumorale en limitant l'action des lymphocytes T^{53,54}. Les mécanismes impliqués au cours du recrutement de ces populations sont exposés dans la **figure 4** et comprennent :

- L'expansion de lymphocytes T régulateurs
- L'induction de lymphocytes T anergiques, via l'expression de la protéine Programmed cell death 1 ligand (PD-L1)

- Une diminution de la prolifération lymphocytaire

- L'inhibition du recrutement et de l'activation lymphocytaire (notamment médiée par la production d'espèces réactives de l'oxygène)

- Une majoration de l'apoptose lymphocytaire

- La métabolisation d'acides aminés (notamment de l'arginine essentiels à la croissance et à la différenciation lymphocytaire).

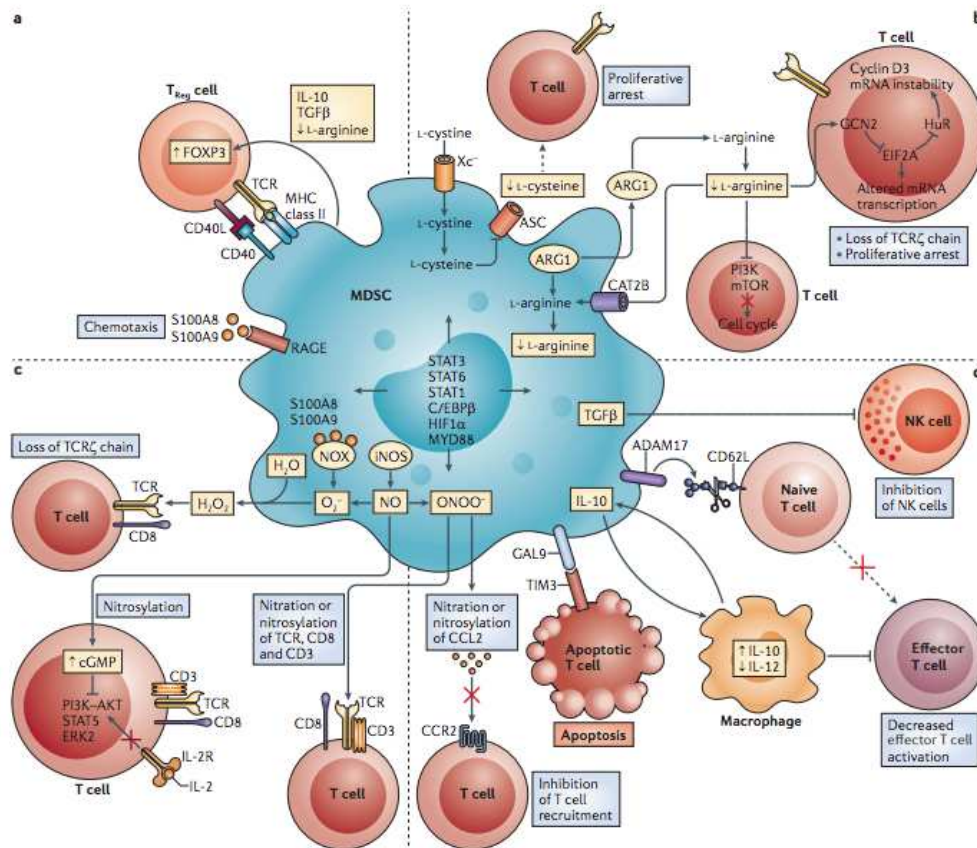


Figure 4. Mécanismes d'inhibition des fonctions lymphocytaires T par les MDSC. D'après Gabrilovich et al.⁵⁵.

a) Les MDSC induisent le développement de cellules T régulatrices (Treg) ou favorisent l'expansion des populations T régulatrices préexistantes. Les protéines de liaison au calcium S100A8 et S100A9 sont impliquées dans la chimiotaxie des MDSC. Ces effets sont médiés en partie par l'activation du récepteur des produits finaux de glycation avancée (RAGE). Concomitamment, S100A8 et S100A9 ainsi que gp91phox favorisent la production de ROS par les MDSC.

b) Les MDSC privent les cellules T des acides aminés essentiels à leur croissance et à leur différenciation.

c) Les MDSC libèrent des molécules oxydantes, telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et peroxynitrite ($ONOO^-$). Le peroxynitrite provoque la nitration et la nitrosylation de composants du complexe de signalisation du récepteur des lymphocytes T (TCR) et l' H_2O_2 provoque la perte de la chaîne ζ du TCR, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes T par le TCR.

d) Les MDSC peuvent également interférer avec la migration et la viabilité des lymphocytes T.

Neutrophiles immatures

Le sepsis est caractérisé par le recrutement massif de PNN matures et immatures sous l'action de cytokines pro-inflammatoires^{56,57}. L'importante proportion de cellules immatures dans le sang circulant, également appelée myélémie, caractéristique des formes sévères de sepsis, s'associe à la survenue de dysfonctions immunitaires. Ces perturbations notables comprennent notamment de moindres capacités de migration des PNN (médiées par une diminution de l'expression membranaire du récepteur de chimiokine CX chemokine receptor-2 (CXCR-2)⁵⁸) sur le site de l'infection, des fonctionnalités dérégulées ainsi que la présence prolongée de NETs dans les tissus et dans le système vasculaire^{59,60}.

Lymphocytes T régulateurs

Afin de maintenir l'homéostasie, l'expansion des lymphocytes T régulateurs au cours des états infectieux joue initialement un rôle bénéfique en limitant les dommages induits par une réaction pro-inflammatoire exacerbée tout en permettant le développement de la mémoire immunologique. Néanmoins, les mécanismes mis en œuvre peuvent participer à la survie et à la prolifération du pathogène responsable du sepsis et à la survenue de mécanismes anti-inflammatoires persistants dont les conséquences apparaissent plus tardivement. Ces cellules, dont la présence dans le sang est associée à une diminution des capacités de prolifération des lymphocytes T ainsi qu'à la survenue d'une anergie lymphocytaire⁶¹, sont également capables d'inhiber l'action des lymphocytes par l'intermédiaire de facteurs solubles (IL-10, Transforming Growth Factor- β (TGF- β)). Elles sont également capables d'induire directement l'apoptose des lymphocytes T effecteurs par l'action de granzymes. Ces cellules contribuent également aux perturbations métaboliques (déplétion en IL-2, inhibition médiée par l'adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPc)) responsables d'une altération de la prolifération des cellules immunitaires. Enfin, ces cellules inhibent la maturation et les fonctions des cellules dendritiques⁴² (**Figure 5**).

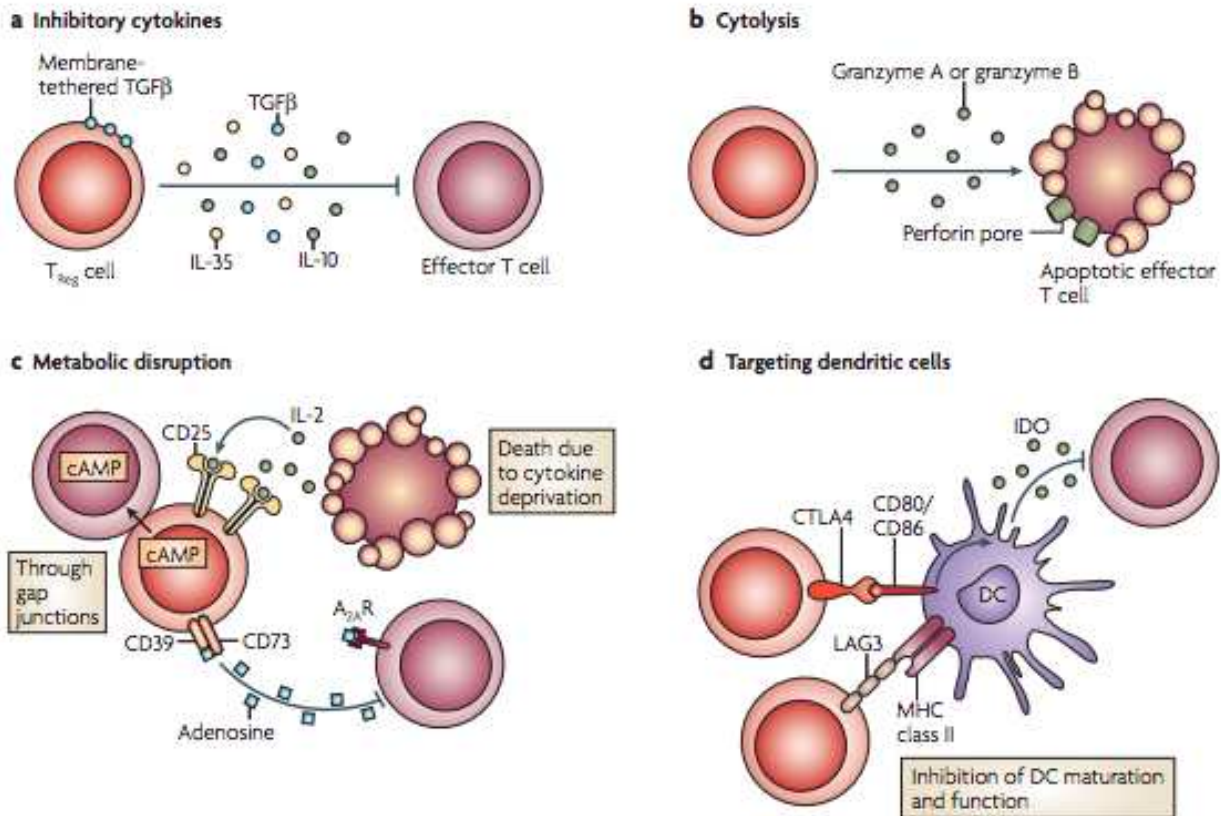


Figure 5. Principaux mécanismes immunosuppresseurs médiés par les lymphocytes T régulateurs. D'après Vignali et al. ⁴².

a) Production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL-35 et le TGF β .

b) Les lymphocytes T régulateurs favorisent l'apoptose lymphocytaire par leurs fonctions cytolytiques responsables de la formation de porines sous l'action des granzymes A et B.

c) Induction d'une perturbation métabolique caractérisée par une privation en IL-2 responsable d'une majoration de l'apoptose lymphocytaire et inhibition de la prolifération médiée par l'AMPc.

d) Modulation de la maturation et des fonctions des cellules dendritiques par l'intermédiaire de l'expression du gène d'activation des lymphocytes (LAG3 : Lymphocyte Activation Gene 3) et de l'antigène 4 des lymphocytes cytotoxiques (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 : CTLA4). Les cellules dendritiques vont alors entraîner une privation en tryptophane, médiée par la libération d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO).

Lymphocytes B régulateurs

L'expansion de lymphocytes B peut survenir sous l'influence de divers stimuli, tels que l'activation des TLRs et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Parmi les cellules B, certaines sont caractérisées par leurs capacités à produire des cytokines immunorégulatrices. Ces lymphocytes, initialement décrits dans le contexte de maladies auto-immunes (sclérose en plaque) semblent jouer des rôles particuliers dans des situations larges comprenant notamment le contrôle des infections. Le premier mécanisme immunorégulateur dont sont dotées ces cellules est la production d'IL-10, formant une population depuis appelée "lymphocytes B10"⁶². D'autres médiateurs solubles comme l'IL-35 ou le TGF- β sont produits par ces cellules, favorisant le développement de lymphocytes T régulateurs et induisant une anergie lymphocytaire^{63,64}. Plus récemment, l'exploration de l'augmentation de l'adénosine circulante au cours d'un modèle murin de péritonite a permis la découverte de l'expansion d'un sous-type de lymphocytes B, CD39^{hi}, responsables d'une diminution des fonctions bactéricides des macrophages et d'une augmentation de la production d'IL-10⁶⁵.

Au-delà de l'émergence de nouvelles populations cellulaires, lorsqu'une infection est suffisamment sévère pour entraîner un SIRS, les cellules immunitaires vont rencontrer diverses évolutions touchant particulièrement les lymphocytes T et aboutissant à la survenue d'une lymphopénie profonde.

3.3) Principaux mécanismes de la lymphopénie

La lymphopénie, définie comme une diminution du nombre de lymphocytes au sein du sang circulant (inférieur à $1500/\text{mm}^3$), reflète les dysfonctions du système immunitaire adaptatif. Les diverses études s'attellant à évaluer l'évolution des populations lymphocytaires au cours des états infectieux ont constamment rapporté la survenue d'une lymphopénie dont la profondeur et la persistance sont corrélées à la sévérité des patients⁶⁶⁻⁶⁹. Les différents mécanismes aboutissant à cet état de lymphopénie comprennent essentiellement une majoration de la mort cellulaire par apoptose, une diminution de la capacité de prolifération de ces cellules ainsi qu'une séquestration au sein de certains organes sites de l'infection^{70,71}.

Apoptose lymphocytaire

Évidences et mécanismes

L'apoptose, terme issu du grec désignant la chute des feuilles d'un arbre en automne (phénomène biologiquement contrôlé), est une forme de mort cellulaire programmée dont les mécanismes sont étroitement régulés. Le sepsis, et plus encore le choc septique, sont caractérisés par un renforcement de l'apoptose des populations lymphocytaires. Cette apoptose, reconnue par les travaux de Richard Hotchkiss depuis le début des années 2000, détient un rôle clé au cours du sepsis. Les premières constatations de ce processus sont issues d'une étude menée en réanimation comparant des patients décédés d'un sepsis à d'autres pour lesquels la cause du décès n'était pas infectieuse⁷². Les autopsies réalisées chez ces patients révélaient, en effet, une apoptose lymphocytaire soutenue chez les patients septiques. D'autres travaux ultérieurs ont souligné la responsabilité prépondérante de ce mécanisme quant à la survenue de la lymphopénie caractéristique des états infectieux sévères^{69,73}.

L'exploration des mécanismes responsables de cette apoptose s'est appuyée sur les études humaines mais également sur l'utilisation de modèles animaux de sepsis permettant une évaluation fine des organes lymphoïdes primaires et secondaires (thymus, et rates essentiellement). La mise en évidence de l'implication

de différentes voies a ainsi été soulignée, comportant notamment une voie intrinsèque et une voie extrinsèque⁴⁷. La signalisation de la voie intrinsèque, médiée par les mitochondries, survient via l'activation des protéines pro-apoptotiques de la famille B-cell Lymphoma 2 (Bcl-2) induisant au niveau de la membrane externe de la mitochondrie une perte de potentiel membranaire. Ceci conduit à une ouverture de pores responsable de la libération du contenu mitochondrial dans le cytosol (cytochrome C, procaspase-9, Apaf-1) favorisant l'activation de la caspase-9⁷⁴. La voie extrinsèque est activée par des "signaux de mort" (DAMPs, PAMPs, cytokines) activant les récepteurs membranaires (Fas, Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL), TNF receptor-I et II). L'activation de ces récepteurs conduisent à l'activation de la caspase-8. Alors que la voie intrinsèque, ou voie mitochondriale, est activée par divers stimuli dont la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Les 2 types de caspases, dont l'activation va dépendre de nombreux facteurs, parfois intriqués, régulent l'activation de la caspase-3 dont l'activité protéase entraîne la fragmentation de l'ADN, étape cruciale du processus d'apoptose⁷⁵.

Par ailleurs, cette apoptose lymphocytaire va, au cours du sepsis, épargner les lymphocytes T régulateurs renforçant ainsi la proportion de ces cellules immunosuppressives parmi l'ensemble du contingent lymphocytaire. Cet échappement à l'apoptose lymphocytaire est médié par une surexpression de la protéine Bcl-2^{76,77}.

Enfin, d'autres formes de morts cellulaires contribuant à la lymphopénie sont observées au cours du sepsis telles que la nécroptose et la pyroptose⁷⁸. Ces formes de morts cellulaires étant marginales, nous ne nous sommes pas attelés à les évaluer au cours de nos travaux et nous ne les aborderons pas dans cette introduction.

Conséquences de l'apoptose lymphocytaire

L'apoptose lymphocytaire va rapidement entraîner des perturbations du fonctionnement du système immunitaire représentées dans la **figure 6**. Outre la diminution des fonctions immunitaires induites par la lymphopénie, les lymphocytes

apoptotiques ont des effets immunosuppresseurs propres. Les cellules apoptotiques induisent, en effet, une anergie des macrophages et une tolérance à l'endotoxine médiée par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β)^{79,80}. La phagocytose des lymphocytes apoptotiques par les macrophages et cellules dendritiques limite l'expression des molécules de co-stimulation entraînant une anergie ou encore une apoptose de ces cellules. Enfin, les lymphocytes apoptotiques induisent, sur les autres lymphocytes circulants, des effets immunosuppresseurs (diminution de leur activation, de leur différenciation, de la cytotoxicité et de la production d'anticorps ou encore induction de phénotypes régulateurs) contribuant, entre autres, à limiter leurs capacités à proliférer⁸¹.

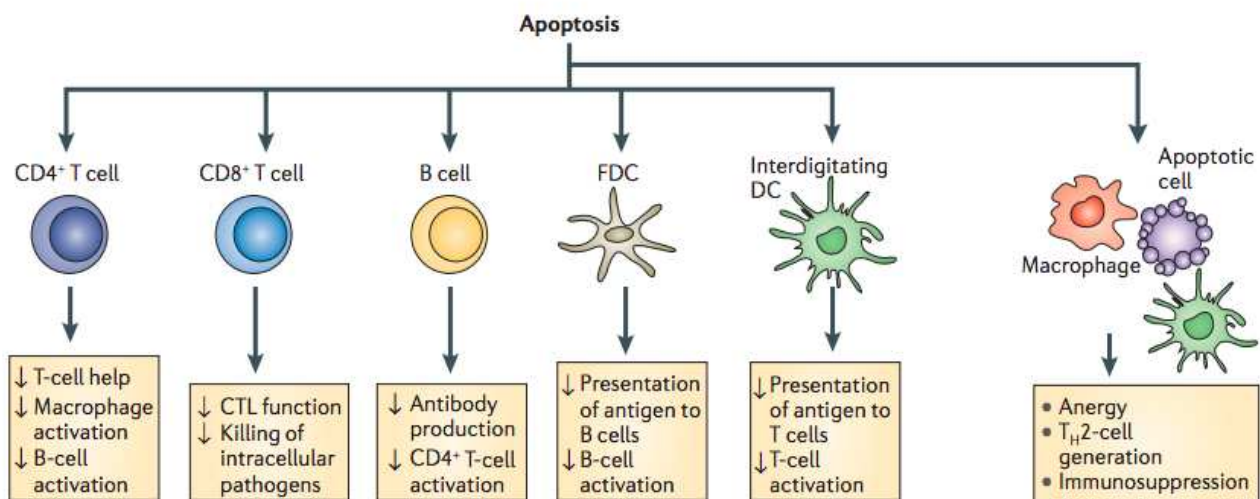


Figure 6. Conséquences de l'apoptose sur les fonctions immunitaires. D'après Hotchkiss et al.⁸¹

L'apoptose provoque une immunosuppression par divers mécanismes :

- Déplétion des différentes cellules immunitaires (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules dendritiques, cellules dendritiques folliculaires) responsable d'une perte des fonctions antimicrobiennes essentielles.
- Altération de l'immunité par l'induction d'une anergie et d'un phénotype anti-inflammatoire (macrophages).

Diminution de la prolifération lymphocytaire

Le nombre de lymphocytes circulants est issu d'un équilibre entre la prolifération et l'élimination de ces cellules. La lymphopénie septique semble également attribuable à une diminution de l'expansion clonale lymphocytaire^{82,83}. Les mécanismes aboutissant à cette perte de fonction impliquent diverses voies. Des études ont démontré que les lymphocytes circulants de patients atteints de sepsis étaient caractérisés par l'expression de marqueurs d'épuisement cellulaire tels que le marqueur PD-1 (Programmed Cell Death-1) ou encore le marqueur CTLA4⁸⁴⁻⁸⁶. L'induction de ces phénotypes est favorisée par l'émergence des lymphocytes régulateurs (T et B)⁶¹ responsables notamment d'une majoration de la production d'IL-10 et de l'adénosine par l'intermédiaire du récepteur A2aR⁸⁷. Physiologiquement, la prolifération lymphocytaire est favorisée par une activation médiée par la présentation antigénique, rôle joué par les cellules dendritiques. Au cours d'une stimulation par du LPS, une diminution des capacités de présentation antigénique a été objectivée, limitant ainsi l'activation lymphocytaire et donc l'expansion clonale de ces cellules⁸⁸. Par ailleurs, le recrutement de MDSC et de PNN immatures joue un rôle essentiel au cours de ce phénomène contribuant à la survenue d'une faillite métabolique impliquant notamment le métabolisme de l'arginine par une majoration de l'activité arginase-1⁸⁹. Ces cellules contribuent également à la survenue d'une privation cytokinique, notamment en IL-2 et en IFN- γ ⁹⁰.

Afin de limiter les conséquences de cette lymphopénie, des stratégies thérapeutiques expérimentales visant à limiter l'apoptose lymphocytaire ont été envisagées comprenant une inhibition des caspases ou encore l'utilisation d'IL-7 et d'anti-PD-1^{83,91-93}. Ces thérapeutiques ont montré des effets bénéfiques chez les animaux traités comprenant notamment une diminution de la susceptibilité aux infections secondaires dont la survenue s'inscrit dans le cadre du concept d'immunodépression associée au sepsis.

Ces mécanismes immunologiques vont être à l'origine d'une mortalité tardive chez les patients hospitalisés en réanimation, essentiellement liée à l'acquisitions d'infections secondaires et de dysfonctions d'organes induites par le sepsis.

3.4) Immunodépression associée au sepsis et mortalité tardive

Évidences et théorisation du concept

L'incidence majorée d'infections secondaires après une infection sévère a été largement démontrée¹². L'étude de ces infections a révélé qu'elles impliquaient des pathogènes différents de ceux rencontrés au cours des infections communautaires des patients immunocompétents. L'écologie des infections acquises est en effet caractérisée par une forte proportion d'infections secondaires à des pathogènes peu virulents ou qualifiés d'opportunistes (*Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Candida* ou encore *Aspergillus*)⁹⁴⁻⁹⁷. La survenue d'infections à ces pathogènes habituellement observés chez les patients sévèrement immunodéprimés, reflète les perturbations de l'immunité de l'hôte au cours de ces affections.

Dans le sillage de ces infections nosocomiales bactériennes ou fongiques, les fondements de cet état d'immunodépression se sont également appuyés sur la constatation d'une fréquence accrue de réactivations de virus latents au cours de ces affections tels que les virus du groupe herpès (Herpès simplex virus, Cytomégalovirus, Varicelle Zona virus, Epstein-Barr virus)⁹⁸⁻¹⁰². Ces réactivations étaient, là encore, associées à un assombrissement du pronostic des patients¹⁰³. Il est vraisemblable qu'une minorité de ces patients présentaient une infection virale invasive alors que la majorité des réactivations de ces virus latents était imputable à la survenue de dysfonctions immunitaires. Ces constatations cliniques ont pavé le changement de paradigme de la réponse inflammatoire du sepsis.

Cinétique et dualité de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire au cours des infections a longtemps été envisagée comme l'ensemble des réactions pro-inflammatoires ayant pour objectif la destruction du pathogène responsable de l'infection mais dont les conséquences peuvent aboutir aux défaillances d'organes. Les évidences cliniques des perturbations tardives du système immunitaire et la découverte de marqueurs biologiques d'immunodépression chez ces patients ont révélé que cette conception simpliste était incomplète. Un scénario séquentiel a alors été envisagé au sein duquel la survenue de mécanismes anti-inflammatoires compensateurs succède à la

réponse pro-inflammatoire initiale^{104,105}. Finalement, la mise en évidence de la coexistence de mécanismes pro et anti-inflammatoires concomitants dès la phase précoce du sepsis a aboli ce concept séquentiel à la faveur d'un modèle plus complexe mêlant l'ensemble de ces réponses¹⁰⁶ (**Figure 7**). Les implications cliniques qu'implique la dualité de la réponse inflammatoire sont essentielles et sont principalement composées de dysfonctions d'organes attribuables à l'excès de production de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à un risque accru d'acquisition d'infections secondaires.

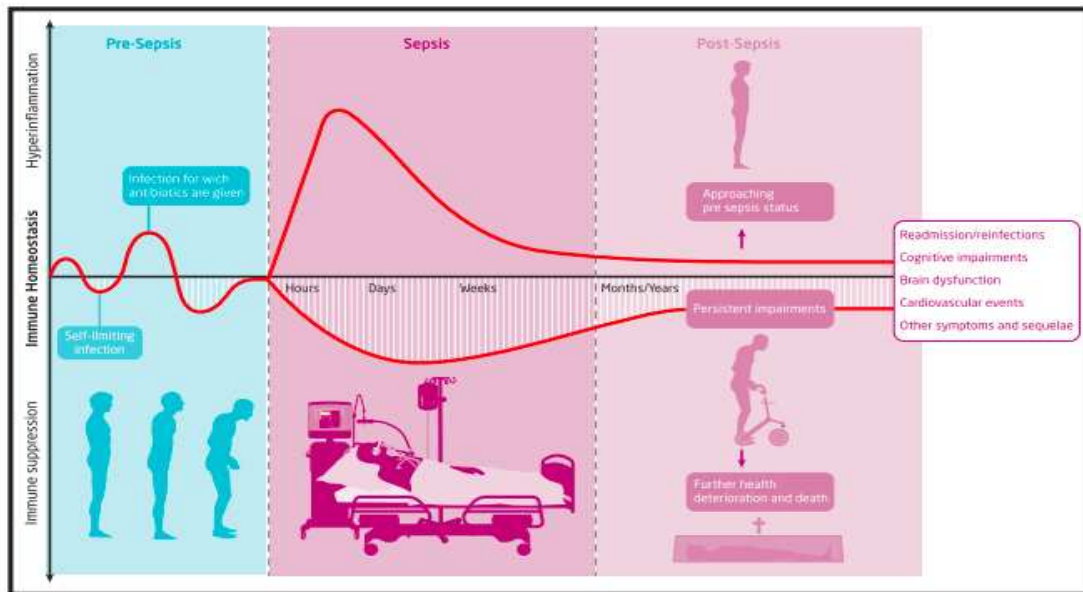


Figure 7. Dynamique de la réponse immunitaire et implications cliniques
D'après Van der Poll et al.¹⁰⁶

Ce modèle conceptuel des trajectoires immunitaires objective la dualité de la réponse inflammatoire, composée simultanément de mécanismes pro et anti-inflammatoires. La réponse pro-inflammatoire exacerbée peut aboutir aux dysfonctions des organes vitaux et à un décès précoce. Alors que la réponse anti-inflammatoire va contribuer à la survenue de réactivations virales, d'infections secondaires et de dysfonctions chroniques d'organes, responsables d'une majoration de la morbi-mortalité induite par le sepsis.

L'immunodépression acquise lors des états septiques va être à l'origine d'évènements cliniques qui vont influencer le séjour du patient : la persistance de dysfonctions d'organes et la survenue d'infections acquises.

3.5) Implications cliniques

Dysfonction d'organes : physiopathologie et traduction clinico-biologique

Au sein de la définition du sepsis du consortium SEPSIS-3, la présence de dysfonctions d'organes est la pierre angulaire du diagnostic de sepsis et de choc septique⁷. Afin d'évaluer les dysfonctions d'organes, cette définition s'appuie sur un score objectif développé initialement en 1996 afin de retranscrire la sévérité des patients de réanimation, le SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)¹⁰⁷. Le diagnostic de sepsis est retenu si le score SOFA est supérieur ou égal à 2. Au-delà du diagnostic de sepsis, l'évaluation séquentielle et objective des dysfonctions évaluées au sein du SOFA (**Table 3**) permet la quantification des dysfonctions d'organes et l'évaluation du pronostic des patients¹⁰⁸.

Score SOFA

Score	0	1	2	3	4
Respiratoire PaO ₂ /FiO ₂	≥400	<400	<300	<200	<100
Coagulation Plaquettes (G/L)	≥150	<150	<100	<50	<20
Hépatique Bilirubine (μmol/L)	<20	20-32	32-101	102-204	>204
Cardiovasculaire Pression artérielle Moyenne (mmHg)	≥70	<70	Dobutamine ou dopamine <5μg/kg/min	Dobutamine 5-15 ou adrénaline/noradrénaline <0.1μg/kg/min	Dobutamine >15 ou adrénaline/noradrénaline >0.1μg/kg/min
Système nerveux central Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Rénal Créatininémie (μmol/L)	<110	110-170	171-299	300-440	>440

Tableau 3. Score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment).
D'après Vincent et *al.*¹⁰⁷

L'évaluation séquentielle et objective des défaillances des principaux organes vitaux par ce score est un des fondements du diagnostic du sepsis.

La survenue de ces dysfonctions est intimement liée à une réponse pro-inflammatoire exacerbée comportant notamment une sécrétion cytokinique majeure. Ces peptides participent à la survenue de lésions tissulaires. Les cytokines vont en effet contribuer à l'activation de l'endothélium vasculaire conduisant à une augmentation de la perméabilité capillaire¹⁰⁹. Certaines cytokines entraînent des perturbations de la coagulation comprenant la survenue de microthromboses contribuant aux défauts perfusionnels des différents organes responsables d'une hypoxie locale et d'une souffrance cellulaire globale. La traduction clinique de cette souffrance tissulaire dépend de l'organe touché mais elle comprendra de manière constante la survenue d'une hypotension artérielle définissant l'état de choc septique. Cette hypotension artérielle contribue également aux défaillances des autres organes vitaux en majorant les défauts de perfusion tout d'abord et enfin en renforçant l'inflammation systémique. L'évolution des patients souffrant de ces atteintes peut alors aboutir à un état de défaillance multiviscérale mettant en péril leur pronostic vital.

Le SOFA permet ainsi une approche des conséquences du choc septique sur les organes vitaux. En effet, l'évaluation de la gravité d'un patient atteint d'un sepsis est communément réalisée en détaillant le fonctionnement pulmonaire (ou hématose), la coagulation (et notamment la survenue d'une thrombopénie), la présence d'une dysfonction hépatique, l'altération de la vigilance (la survenue d'une encéphalopathie) et enfin la présence d'une dysfonction rénale (**Figure 8**). Parmi dysfonctions d'organes induites, les lésions pulmonaires sont primordiales. Ces atteintes peuvent entraîner une hypoxémie dont l'ampleur définit la survenue d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) secondaire à une atteinte alvéolaire médiée notamment par un afflux de PNN¹¹⁰. L'exploration de ces lésions a bénéficié d'une attention rigoureuse au cours de nombreuses études cliniques et animales¹¹¹. Ces travaux ont permis tout d'abord de souligner l'impact de cette défaillance respiratoire sur le pronostic des patients septiques¹¹². D'autre part, ces études ont permis d'appréhender les mécanismes responsables de ces lésions soulignant l'implication, entre autres, des PNN¹¹³⁻¹¹⁵ ou encore du rôle essentiel des cytokines régulées par l'inflammasome (notamment l'IL-18)¹¹⁶. Enfin, une caractérisation anatomopathologique des lésions pulmonaires observées a pu être établie. Ces lésions sont composées d'un œdème alvéolo-interstitiel généralisé associé à une

destruction de l'épithélium squameux souvent recouvert de membranes hyalines et à une prolifération des cellules épithéliales de type II entraînant un épaissement de la membrane alvéolo-capillaire. Plus tardivement dans l'évolution du sepsis, sont décrites des lésions de fibroses accompagnées d'une destruction architecturale¹¹⁷.

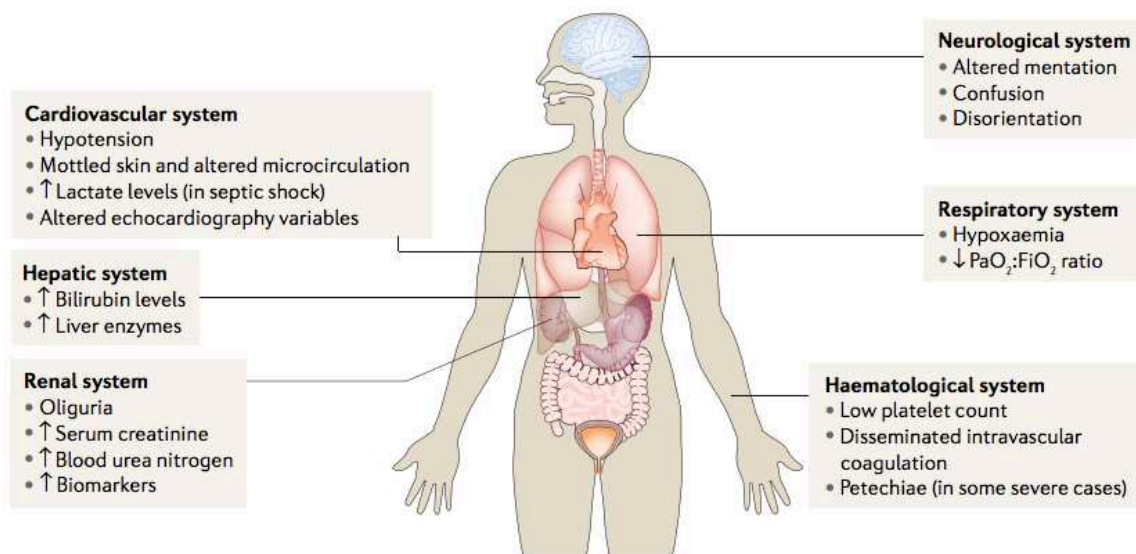


Figure 8. Principaux organes atteints au cours du sepsis.
D'après Lelubre et al.¹¹⁸

La surveillance d'un patient atteint de sepsis s'appuie sur une évaluation rigoureuse des atteintes des différents systèmes de l'organisme comportant notamment une évaluation hémodynamique, neurologique, respiratoire, hématologique, rénale ou encore hépatique.

De la sévérité de l'infection initiale à la susceptibilité aux infections secondaires

Comme nous l'avons décrit précédemment, la dysfonction immunitaire va exposer les patients aux infections acquises. L'étude de ces événements est essentielle tant par leur fréquence qu'en raison de leur impact sur le pronostic des patients.

Un événement crucial

Les infections secondaires ont un impact majeur dans le parcours des patients septiques. Il est estimé que ces infections affectent entre 15 et 20% des patients atteints de choc septique^{12,119-121}. La gravité du tableau initial est proportionnelle au risque d'infections nosocomiales. Les patients admis en réanimation sont particulièrement exposés à ces complications, d'abord en raison de la sévérité de leur état, mais également en raison du recours à des procédures vulnérantes (utilisation de cathéters, intubation, sondage urinaire...). L'ampleur des conséquences de ces infections est d'une évaluation plus délicate puisqu'elle implique une évaluation à plus long terme des patients. Il a cependant été établi que ces infections sont responsables de l'essentiel de la mortalité tardive attribuables au sepsis^{12,13,119}.

L'importance de ces infections tant par le poids de leurs incidences que par leurs conséquences sur le pronostic des patients font de la compréhension des mécanismes impliqués et de leur prévention les principaux défis des décennies à venir.

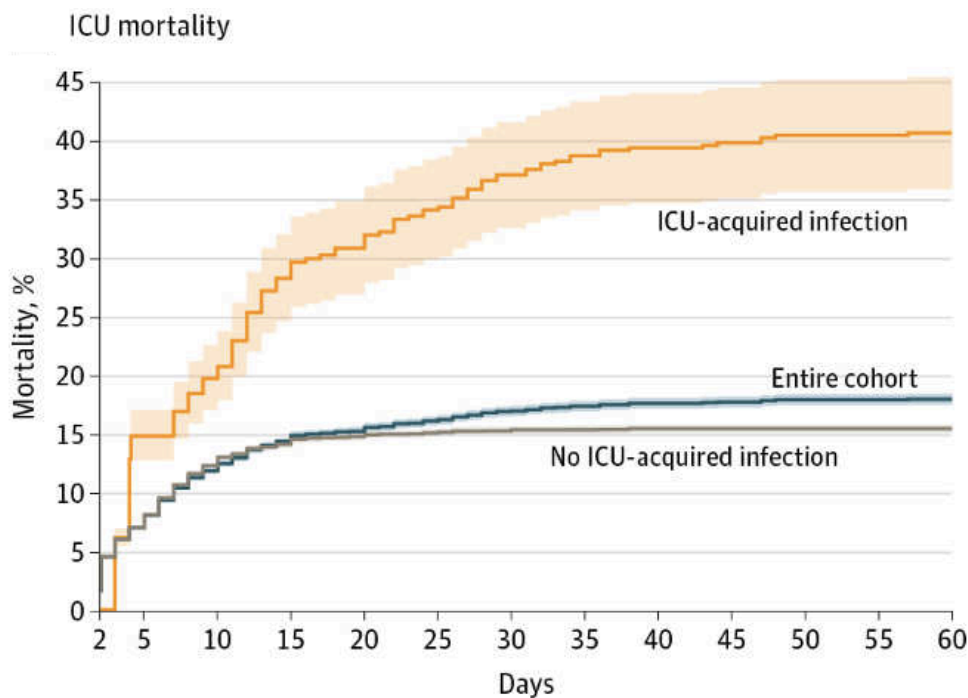


Figure 9. Mortalité attribuable aux infections acquises en réanimation. D'après Van Vught *et al.* ¹²

Mortalité estimée chez les patients de réanimation selon la survenue d'infections secondaires.

Physiologie et mécanismes immunitaires impliqués

Des études cliniques translationnelles ont permis de dresser le portrait du fonctionnement immunitaire en fonction de la survenue d'infections nosocomiales. Les pionniers de ces explorations d'immunomonitoring¹²² ont ainsi rapporté que les patients développant des infections nosocomiales présentaient divers stigmates de dysfonctions immunitaires tels qu'une proportion de lymphocytes T apoptotiques significativement plus importante⁶⁹, une lymphopénie persistante⁶⁶, une diminution de l'expression monocyttaire de l'antigène HLA-DR^{123,124}, une diminution du nombre de cellules dendritiques circulantes¹²⁰, une augmentation de l'expression lymphocytaire de PD-1 et enfin plus récemment un recrutement de MDSC⁵¹. Au cours

de cette étude ont été objectivées des associations entre l'expansion des MDSC et une inhibition de la prolifération lymphocytaire ainsi qu'avec la survenue d'infections nosocomiales. Les patients développant des infections nosocomiales présentaient également des concentrations plasmatiques de S100A12 et de G-CSF significativement plus élevées. Enfin ces patients avaient des concentrations plasmatiques en arginase-1 également plus élevées (dont l'essentiel de la production est attribuable aux G-MDSC).

Ainsi, le choc septique est à l'origine d'une dysfonction des cellules du système immunitaire et plus particulièrement des lymphocytes T. Alors qu'il existe une association claire entre dysfonction lymphocytaire T, émergence des MDSC et survenue d'infections acquises, les mécanismes à l'origine de ces dysfonctions ne sont pas tous parfaitement identifiés. Si l'axe MDSC-lymphocytes T a d'abord été exploré dans le cancer et plus particulièrement dans le microenvironnement tumoral, plusieurs études laissent à penser que le choc septique est aussi marqué par des modifications métaboliques dont la correction pourrait permettre d'améliorer la morbidité et la mortalité du choc septique. Dans cette partie, nous explorerons plus particulièrement l'axe arginine-dysfonction mitochondriale.

Chapitre IV. Métabolisme et réponse immunitaire

Les mécanismes mis en œuvre au cours de la réponse anti-infectieuse sont pourvoyeurs d'une importante dépense énergétique. Cette dépense énergétique nécessite la formation d'adénosine triphosphate (ATP) issue de différentes voies comprenant la glycolyse, la glycogénolyse, la néoglucogenèse et une dégradation protéique. Au-delà de la composante énergétique, l'activation et la prolifération des cellules immunitaires se déroulent sous l'influence de la biodisponibilité de certains acides aminés comme l'arginine. Les explorations menées dans les domaines de la cancérologie et du sepsis ont permis la mise en évidence de l'influence du recrutement des MDSC sur la biodisponibilité en arginine ainsi que du caractère crucial de cet acide aminé au bon fonctionnement lymphocytaire.

4.1) Métabolisme de l'arginine et sepsis

La L-arginine (arginine dans le reste de l'exposé) est un acide aminé semi-essentiel (indispensable en période de croissance, elle peut prendre les caractéristiques d'acide aminé essentiel dans certaines situations au cours desquelles sa synthèse est insuffisante pour couvrir les besoins). Sa concentration cellulaire est issue de l'équilibre entre les apports nutritionnels, la synthèse *de novo*, la dégradation protéique et enfin la consommation d'arginine par l'organisme¹²⁵. La synthèse d'arginine *de novo* est majoritairement issue de la citrulline (environ 60%). Cette conversion fait suite à l'action combinée des enzymes arginosuccinate synthetase (ASS) et argininosuccinate lyase (ASL). L'arginine alors produite peut être dégradée par 5 différents groupes d'enzymes : les arginases (au cours du cycle de l'urée), les Nitric Oxide synthases (NOS, dans le cadre de la production de NO), les arginine decarboxylases (ADC), les arginine:glycine amidinotransferases (AGAT) et les arginyl-tRNA synthetase (ArgRS)¹²⁶ (**Figure 10**).

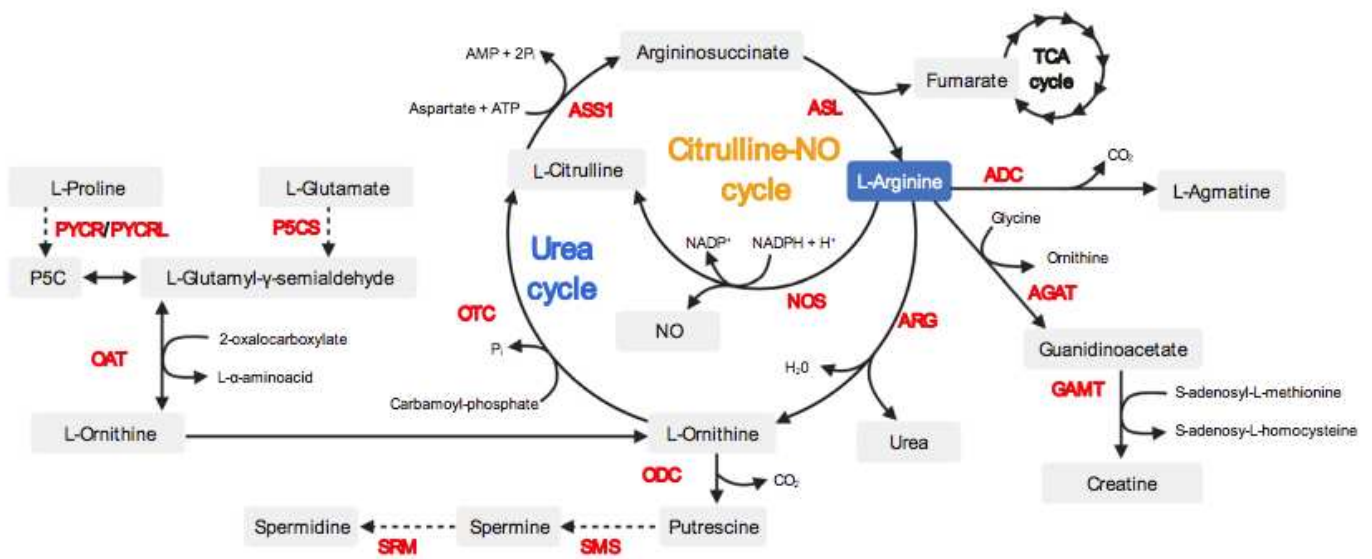


Figure 10. Principales voies impliquées dans le métabolisme de l'arginine. D'après Líndez et al.¹²⁷

La métabolisation de la L-arginine survient sous l'influence de 5 enzymes : Les NO Synthases (NOS), les arginases (ARG), l'arginine:glycine aminotransférase (AGAT) et l'Arginine décarboxylase (ADC) et les arginyl-tRNA synthetases (ArgRS). La L-Citrulline est convertie en arginine par les argininosuccinate synthases 1 (ASS1) et les argininosuccinate lyases (ASL).

Au cours des états de stress en général, et particulièrement au cours du sepsis, l'équilibre entre la synthèse et l'utilisation de l'arginine va être confronté à d'importantes modifications qui aboutissent à une diminution de la biodisponibilité de cet acide aminé. Les mécanismes responsables de ce déséquilibre comprennent :

- Une diminution de la synthèse *de novo* de l'arginine liée à une diminution des apports entéraux de ses précurseurs (citrulline et protéines essentiellement), les dysfonctions entérocytaires limitant l'absorption des précurseurs^{128,129} ou encore la survenue d'insuffisance rénale¹³⁰.

- Une consommation excessive liée à une augmentation de l'activité des enzymes catabolisant l'arginine (NOS et Arginase principalement)^{51,131}.

Cet état d'hypoargininémie dont la profondeur est corrélée à la gravité des patient¹³² est ainsi communément décrit au cours des états infectieux.

4.2) Arginine et dysfonctions lymphocytaire

Le rôle de l'arginine au sein de la réponse immunitaire a bénéficié de nombreuses études consacrées aux perturbations métaboliques survenant au cours de néoplasies¹³³. Ces explorations ont permis de souligner l'importance de cet acide aminé dans les processus d'échappement tumoral et au sein de la constitution du microenvironnement tumoral^{134–136}. Les implications immunitaires de l'arginine sont nombreuses et touchent diverses populations cellulaires. Les premières descriptions des effets délétères d'un déficit en arginine, en 1968, soulignaient déjà le rôle essentiel de l'arginine au cours de l'activation et de la prolifération des lymphocytes¹³⁷. D'autres études ultérieures confirmèrent ce phénomène^{127,138,139}. Cet acide aminé régulant l'expression de la chaîne zêta, chaîne majeure de la signalisation du TCR¹⁴⁰, devient un facteur limitant la prolifération de ces cellules en situation de carence. Il a également été démontré que la régulation de l'expression de CD3 ζ est un mécanisme important pour moduler l'activation¹³⁸ et la différenciation des cellules T¹⁴¹. D'autres mécanismes médiés par la carence en arginine participent au déficit de prolifération lymphocytaire tels qu'une altération de la déphosphorylation de la cofiline qui intervient en augmentant la dynamique des réseaux d'actine¹⁴². Par ailleurs, des travaux expérimentaux ont permis d'observer que le déficit en arginine est associé à une diminution de la production d'IL-2¹⁴³ ainsi qu'à une régulation des enzymes du cycle cellulaire (cyclines D1, D2, D3, Cycline dépendant-kinases CDK4 et CDK6) responsable d'un blocage du cycle cellulaire¹⁴⁴. Les conséquences lymphocytaires du déficit en arginine sont résumées au sein de la **Figure 11**. L'arginine influence également la maturation et les fonctionnalités des lymphocytes B et notamment la production plasmocytaire d'anticorps¹⁴⁵.

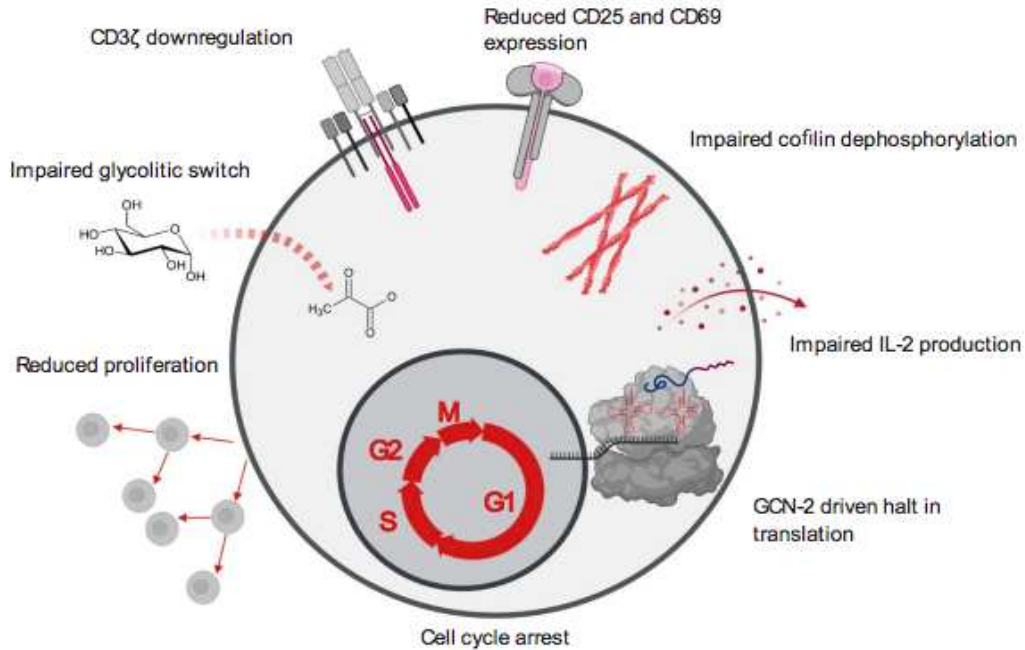


Figure 11. Synthèse des effets immunosuppresseurs du déficit en arginine sur le fonctionnement lymphocytaire. D'après Líndez *et al.*¹²⁷

Le déficit en arginine est responsable de dysfonctions lymphocytaires comprenant une diminution de la prolifération de ces cellules, une inhibition de l'expression du CD3 ζ, un arrêt du cycle cellulaire, une diminution de l'expression des molécules de stimulation CD25 et CD69 et d'une moindre production d'IL-2.

Divers mécanismes au cours de processus pathologiques contribuent à limiter la biodisponibilité en arginine. Les travaux initialement menés dans le domaine de l'oncologie ont permis de découvrir le rôle essentiel des MDSC, notamment par leur activité arginase¹⁴⁶. L'état d'inflammation exacerbé des patients admis en réanimation a également permis d'établir un lien entre l'expansion des MDSC et une diminution de la concentration en arginine¹⁴⁷. Plus récemment, dans le cadre du sepsis, l'évaluation du rôle des MDSC proposée par Uhel *et al.* a permis de souligner les implications métaboliques du recrutement des MDSC objectivant notamment une corrélation entre ces cellules et l'activité arginase ainsi qu'une association avec la survenue de dysfonctions lymphocytaires⁵¹.

Les études consacrées au fonctionnement mitochondrial au cours des pathologies cancéreuses ont également souligné l'importance du métabolisme de l'arginine rapportant la présence d'altération de la respiration mitochondriale au cours

des états de carence en arginine¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Néanmoins, l'évaluation des implications de la carence en arginine sur les dysfonctions mitochondriales du sepsis n'a, jusqu'à présent, jamais été effectuée.

4.3) Fonctionnement mitochondrial et choc septique

Les mitochondries, en tant que site principal de la production d'ATP par la chaîne respiratoire (phosphorylation oxydative), vont particulièrement contribuer à la réponse de l'organisme au cours du sepsis¹⁵¹. Ces organites contribuent non seulement à l'approvisionnement en énergie, à la biosynthèse et au métabolisme oxydatif cellulaire, mais servent également de plate-forme régulant les réponses immunitaires innées (telles que la production de ROS, la NETose) et acquises^{152,153}. Le sepsis constitue donc un état au cours duquel le fonctionnement mitochondrial est essentiel. La survenue de dysfonctions et les dommages mitochondriaux induits par le sepsis sont une cause majeure des troubles du métabolisme cellulaire survenant au cours de cette pathologie. Ces dysfonctions mitochondriales sont causées par divers facteurs comportant notamment l'hypoxie induite par les défauts de perfusion tissulaire limitant alors les réactions de phosphorylation oxydative. Cette hypoxie va alors compromettre la production d'ATP¹⁵⁴ et favoriser les voies de mort cellulaire (voie extrinsèque de l'apoptose). D'autre part, la génération en grandes quantités de NO, de monoxyde de carbone¹⁵⁵, de sulfure d'hydrogène ou encore de radicaux libres inhibe directement la respiration mitochondriale¹⁵⁶ et cause des dommages aux protéines structurelles mitochondriales¹⁵⁷. Enfin, la réponse pro-inflammatoire exacerbée est responsable d'une diminution de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales¹⁵⁸.

Ainsi, les liens entre biodisponibilité en arginine et dysfonctions immunologiques sont nombreux chez les patients sévères. Conceptuellement, la correction de l'hypoargininémie devrait avoir un effet bénéfique sur le pronostic des patients. Néanmoins, les essais cliniques ayant évalué ce traitement n'ont jamais objectivé de bénéfice, au contraire. Ces échecs soulèvent deux questions essentielles : la validité des modèles animaux utilisés au cours du sepsis ayant permis d'observer des effets bénéfiques et les caractéristiques des essais cliniques (immunonutrition et sepsis). Nous envisagerons ces 2 problématiques dans la partie suivante.

Chapitre V. Modèles expérimentaux de sepsis et échecs des essais cliniques

Le recours aux modèles animaux afin d'explorer les mécanismes physiologiques survenant au cours des infections ont permis d'élucider une myriade de problématiques et d'envisager un large panel de thérapeutiques. La validité des conclusions issues de ces expérimentations dépend directement de la fiabilité du modèle utilisé. Divers modèles ont ainsi été développés afin de reproduire le plus fidèlement possible la physiopathologie du sepsis humain.

5.1) Modèles animaux de sepsis

Différents modèles animaux de sepsis ont été développés au cours des décennies passées. L'élaboration de ces modèles a pu faire appel à différentes espèces d'animaux, cependant les modèles murins ont largement dominé ce champ de recherche. Ainsi nous n'aborderons ici uniquement les modèles utilisant ces mammifères.

Stimulus septique

Modèles basés sur l'endotoxine

Depuis les premières descriptions des effets de l'injection de LPS chez les souris il y a près d'un siècle, les modèles d'endotoxémie sont devenus un des piliers de la recherche animale sur le sepsis. L'injection à des souris de LPS purifié (« endotoxine »), soit par voie intrapéritonéale soit par voie intraveineuse, entraîne une activation systémique du système immunitaire inné. Le LPS, ce composant structurel de la paroi externe des bactéries à Gram négatif, est un PAMPs largement décrit qui est reconnu par les récepteurs TLR4 exprimés à la surface des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques entre autres^{159,160}. Cette interaction va entraîner une activation massive de ces cellules, caractérisée par une production de cytokines pro-inflammatoires majeure impliquant notamment la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-1 β ¹⁶¹.

Ce modèle présente les avantages d'être très simple, reproductible et modulable permettant d'induire des infections dont la gravité est prédéterminée, autorisant l'évaluation de différentes phases du sepsis en fonction de la sévérité induite. Néanmoins, cette simplicité comporte des limites inhérentes puisque l'activation de la seule voie du TLR4 ne reflète que partiellement la complexité des mécanismes survenant au cours du sepsis rendant la transposabilité des résultats obtenus à partir de ce modèle à l'Homme difficile.

Ponction Ligature Caecale

Le modèle de ponction ligature caecale ou CLP (Cecal Ligation and Puncture) a été développé en 1980 par l'équipe d'Irshad Chaudry¹⁶². Ce modèle est reconnu comme étant, à ce jour, le "gold standard" en recherche animale sur le sepsis en raison de ses propriétés réalistes, simples et de sa pertinence clinique¹⁶³. Ce modèle consiste en la réalisation d'une laparotomie médiane sous anesthésie générale permettant d'identifier et d'extérioriser le caecum (**Figure 12**). Lequel est alors ligaturé puis ponctionné avant d'être réintroduit dans la cavité péritonéale. Il permet ainsi de combiner trois agressions à l'hôte : le traumatisme tissulaire lié à la chirurgie abdominale, la nécrose provoquée par la ligature du cæcum et l'infection plurimicrobienne secondaire à la fuite de la flore bactérienne intestinale dans le péritoine. Par ailleurs le caractère polymicrobien de l'infection induite permet de mieux approcher l'hétérogénéité des états infectieux observés chez l'humain¹⁶⁴. Plus récemment, a été développé une variante de ce modèle baptisée Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) dont l'objectif est de mimer plus justement une péritonite secondaire à une perforation intestinale (en opposition à la CLP qui induit des conditions plus proches de celles retrouvées lors de la survenue d'un abcès intrapéritonéal)¹⁶⁵.

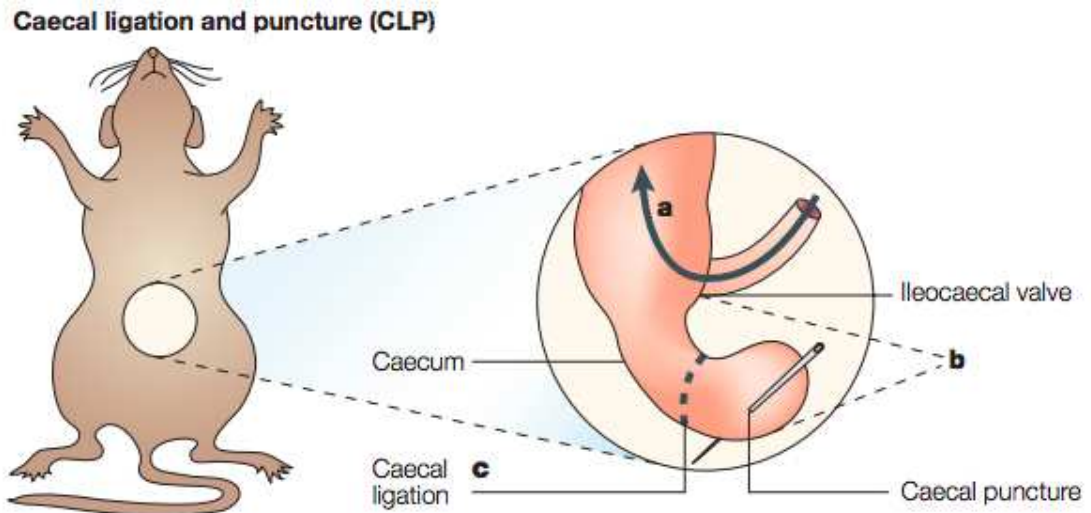


Figure 12. Modèle expérimental de Ponction Ligature Caecale.
D'après Buras et al. ¹⁶⁶

Le modèle CLP de sepsis est induit par laparotomie et exposition de la jonction entre le gros intestin et l'intestin grêle. L'intestin grêle rejoint le gros intestin au niveau de la valve iléo-cæcale (flèche bleue). Le caecum s'étend inférieurement comme une poche borgne. La ligature cæcale a lieu sous la valve iléocæcale dans un espace non obstruant (pointillés bleus). Le caecum ligaturé est ponctionné de part en part, ce qui permet aux matières fécales piégées de s'infiltrer dans la cavité péritonéale normalement stérile.

Cecal Slurry Injection

Le modèle de sepsis *Cecal Slurry Injection* est basé sur une injection intrapéritonéale standardisée en quantité du contenu caecal issu d'un rongeur donneur mis en suspension dans un liquide^{167,168}. La standardisation de la quantité de matières fécales injectée, et donc de l'inoculum bactérien, laisse à penser que ce modèle est plus reproductible que le CLP¹⁶⁷. En revanche, contrairement au CLP, ce modèle ne permet pas d'induire de lésions tissulaires chirurgicales ou ischémiques.

Autres modèles murins de sepsis

D'autres modèles ont plus récemment été suggérés, basés sur des injections intraveineuses ou intrapéritonéales de bactéries. Diverses espèces bactériennes ont été utilisées pour ces modèles que ce soit des bactéries à Gram négatif (*Escherichia*

coli, *Pseudomonas aeruginosa*) ou alors à Gram positif (*Staphylococcus aureus*). L'ampleur de la réponse de l'hôte observée dans ces modèles dépend de la voie d'administration des bactéries, la voie intrapéritonéale montrant des réponses inflammatoires atténuées par rapport à la voie intraveineuse¹⁶⁹.

Par ailleurs, l'exploration spécifique d'autres voies de signalisation est possible, notamment par injection d'oligodésoxynucléotides (ODN) CpG agissant par la voie du TLR9¹⁷⁰ ou par stimulation du TLR2 avec des agonistes lipopeptiques synthétiques chez des souris sensibilisées¹⁷¹.

D'autres modèles ayant pour objectif de mimer la survenue d'infections extra-digestives ont également été développés dont, notamment, les modèles de pneumopathie ou de sepsis urinaire. Les pneumonies peuvent être induites par instillation intranasale ou intratrachéale de bactéries ou encore par aérosolisation^{172,173} alors que les infections des voies urinaires sont induites par injections intravésicales de bactéries¹⁷⁴.

Design des modèles et explorations ciblées

Le développement de ces divers modèles a permis non seulement d'essayer de s'approcher de la réalité clinique du sepsis mais à également autoriser une étude fine des mécanismes du sepsis en s'affranchissant de la composante temporelle. Ainsi, selon la gravité de l'agression septique ces modèles permettent l'évaluation de la mortalité précoce, grâce à l'utilisation de modèles pourvoyeurs d'une agression sévères, mais aussi l'exploration de la mortalité tardive après réalisation d'agressions plus légères et en apportant aux animaux expérimentés des traitements afin de lutter contre le sepsis induit.

Mortalité immédiate

La dynamique de la mortalité au cours du sepsis chez l'humain étant caractérisée par la survenue de deux pics distincts précoce et tardif, les études animales se sont attelées à explorer ces 2 périodes. Historiquement, les modèles animaux de sepsis étaient associés à une mortalité élevée et précoce¹⁶². Une grande proportion des modèles animaux de sepsis permettant de quantifier l'inoculum utilisé afin de reproduire l'agression septique, il est possible de jauger la sévérité de l'infection initiale (modèles basés sur l'endotoxine, Cecal Slurry Injection, pneumopathies...). Au cours du processus de CLP, la sévérité de l'infection induite peut être ajustée en fonction du niveau de la ligature ou de la taille de la ponction, déterminant alors la mortalité attendue ainsi que sa temporalité^{163,175} (**Figure 13**). Une fois la mortalité attendue déterminée, les explorations menées au différents temps forts de la dynamique de ce processus vont autoriser l'exploration de diverses phases de la réponse anti-infectieuse et des conséquences de cette infection sur l'ensemble des organes.

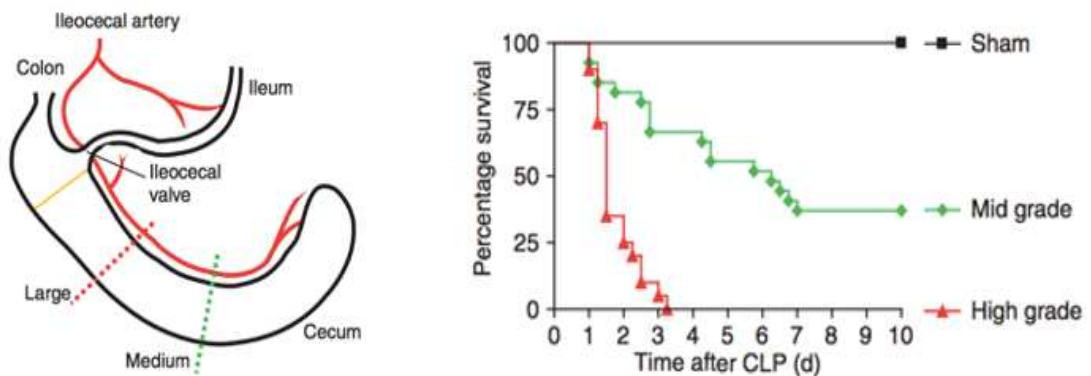


Figure 13. Localisations anatomiques des ligatures caecales au cours de la CLP et impact sur la mortalité induite. D'après Rittirsch et al.¹⁶³

La localisation de la ligature au cours de la CLP va déterminer la sévérité de l'infection induite. Un sepsis de forte intensité est induit lorsque la ligature est proximale (ligne pointillée rouge) alors qu'une ligature plus distale (ligne pointillée verte) est responsable d'une moindre sévérité.

Mortalité tardive

Fortes des constatations issues des études chez l'humain, les expérimentations animales dans le cadre du sepsis se sont attelées, plus récemment, à envisager les conséquences à plus long terme du sepsis¹⁷⁶. Afin de répondre à ces problématiques, des modèles de sepsis moins sévères ont été développés et le suivi des sujets a été allongé¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. D'autre part, afin de mimer au mieux les phénomènes observés chez l'humain, les modèles actuels comprennent également un aspect thérapeutique fondé sur l'utilisation d'antibiotiques et d'une réanimation hémodynamique¹⁸⁰.

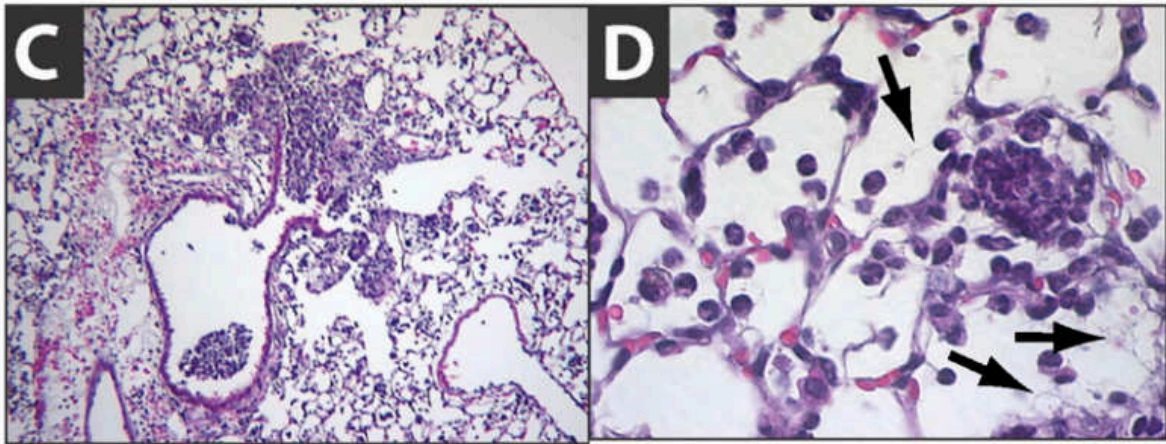
Ainsi, l'utilisation d'un modèle humanisé a permis d'étudier les anomalies chroniques induites par le sepsis.

L'étape suivante a été le développement de modèles permettant d'évaluer :

- Les dysfonctions d'organes
- L'acquisition d'infections secondaires

Dysfonction d'organes

L'importance du concept de dysfonctions d'organes au sein de la définition actuelle du sepsis⁷ rend l'évaluation de ces défaillances nécessaire au cours des modèles expérimentaux. Longtemps, les critères de jugement des études animales se sont focalisés sur la survie et les dosages de biomarqueurs¹⁸¹. Afin de pallier ces lacunes, l'évaluation de ces défaillances a récemment été préconisée¹⁸². Cette évaluation se doit d'être standardisée et elle s'appuie ainsi sur l'utilisation de scores. Parmi les organes requérant une évaluation, la caractérisation des lésions pulmonaires observées au cours des études animales s'appuie sur une évaluation anatomopathologique standardisée réalisée à l'aide du score de lésions pulmonaires (Acute Lung Injury score ou ALI score)¹⁸³.



Paramètres	Score par champ		
	0	1	2
1. Neutrophiles dans l'espace alvéolaire	Aucun	1-5	>5
2. Neutrophiles dans l'espace interstitiel	Aucun	1-5	>5
3. Membranes hyalines	Aucun	1	>1
4. Débris protéiques remplissant les alvéoles	Aucun	1	>1
5. Épaississement septal alvéolaire	<2x	2x-4x	>4x

Tableau 4. Analyses histologiques de poumons et score d'évaluation des lésions pulmonaires. D'après Matute-Bello et al. ¹⁸³

Photographies de lames histologiques de poumons objectivant la présence d'infiltrats neutrophiliques associés à des dépôts de fibrine

Score = $[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)] / (\text{nombre de champs} \times 100)$.

Enfin, l'évaluation de l'atteinte pulmonaire peut également être approchée par une analyse de la cellularité ou des cytokines du liquide broncho alvéolaire¹⁸⁴.

Infections acquises

L'utilisation de modèles animaux de sepsis a également permis d'explorer les facteurs favorisant le risque accru d'infections nosocomiales en limitant les biais de confusions imputables à l'hétérogénéité des infections nosocomiales et en contrôlant la composante temporelle de ces infections. En effet, afin d'évaluer la susceptibilité aux infections secondaires et les thérapeutiques envisageables pour prévenir ou limiter leurs conséquences, des modèles associant une première agression septique suivie par l'induction d'une seconde infection, sous le nom de "Two hit model" ou modèle à deux agressions, ont été développés^{173,185}. Ces modèles permettent de mieux répondre aux nouveaux défis auxquels nous devons dorénavant nous mesurer.

5.2) Limites des modèles

La variété des modèles développés au cours du temps suggère les limites inhérentes à chaque modèle. La standardisation des modèles, tant dans les procédures que dans les individus utilisés, a longtemps été un objectif. Cependant cette stratégie "one size fits all" reflète mal l'hétérogénéité des états infectieux observés chez l'humain et explique probablement en partie les échecs des essais cliniques basés sur des résultats prometteurs issus des études animales¹⁸⁶. Ces résultats contradictoires entre les études animales et humaines ont fait émerger des doutes quant à la pertinence clinique des modèles animaux et de nombreuses limites ont été soulignées pour expliquer ces résultats contradictoires entre les études animales et humaines¹⁸⁷. Afin de limiter les écueils de ces modèles, des recommandations ont récemment été éditées ayant pour but la standardisation des modèles précliniques. Ces recommandations ont été définies comme le « Seuil minimal de qualité au cours des études pré-cliniques de sepsis » ou « Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies » (MQTiPSS)¹⁸⁸. L'objectif de ces recommandations a ainsi été de renforcer la valeur translationnelle des études animales sur le sepsis. Au-delà de la standardisation des modèles, la pertinence de l'utilisation de rongeurs est de plus en plus discutée. Ces animaux sont en effet caractérisés par des systèmes immunitaires qui diffèrent de ceux des humains sur

de nombreux aspects tels l'expression des gènes de l'inflammation ou encore la résistance aux effets toxiques de l'injection de LPS.

Afin de limiter ces biais, l'utilisation de souris mixtes, d'âges différents (afin d'augmenter la variabilité inter-individuelle), élevées en animaleries, génétiquement modifiées¹⁸⁹ ; la mise en place d'essais murins randomisés ou encore la mise au point de modèles faisant appel à d'autres espèces animales¹⁸⁶, sont des méthodes ayant pour objectif de s'approcher plus près de la réalité clinique du sepsis et dont l'utilisation se démocratise progressivement.

De ces modèles sont issus un certain nombre de concepts conduisant à l'émergence de pistes thérapeutiques. Nous ne décrivons pas les études (toutes négatives) immunomodulatrices, essayant de stimuler ou inhiber les réponses immunitaires impliquées dans le sepsis. Nous nous intéresserons, en revanche, plutôt aux essais cliniques s'appuyant sur l'apport d'immunonutriments en tentant d'expliquer la négativité des résultats.

5.3) Immunonutrition : Déceptions thérapeutiques et arginine

Les dernières décennies ont particulièrement été riches en essais cliniques menés chez des patients septiques dont les résultats étaient décevants. Les raisons évoquées afin d'expliquer ces résultats négatifs comprennent l'hétérogénéité des situations de sepsis chez l'Homme, l'absence de contrôle de la temporalité et les défauts de transposabilité des résultats entre animaux et humains^{190,191}. L'immunonutrition, malgré les concepts et les essais précliniques prometteurs^{192,193}, a particulièrement souffert de ces échecs. Cependant, l'interprétation de ces résultats doit être prudente du fait de nombreux problèmes méthodologiques soulignés par les experts dans plusieurs éditoriaux.

Le premier problème réside dans l'inclusion de malades extrêmement hétérogènes (médicaux, chirurgicaux, infections communautaires, infections nosocomiales après plusieurs semaines d'hospitalisation...). Ces études ont en effet inclus des populations de patients extrêmement variées dont la trajectoire immunologique pouvait différer et donc pour lesquels les bénéfices attendus de ces

stratégies divergent. Cette hétérogénéité dans les bénéfices attendus (ou risques encourus) a pu limiter la puissance de ces essais et ne permet donc pas de conclure quant à l'efficacité de l'immunonutrition au cours du sepsis.

Le second problème méthodologique réside dans l'utilisation de plusieurs pharmanutriments en même temps. Ceci ne permet pas une évaluation rigoureuse des effets spécifiques de chaque immunonutriments¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

L'étude spécifique de l'arginine dans le champ de l'immunonutrition a permis de démontrer que son administration entérale n'était pas délétère et augmentait la synthèse d'ornithine, suggérant une utilisation préférentielle de l'arginine par la voie des arginases, sans augmentation de la synthèse de NO ni effet sur les fonctions immunitaires. Cette thérapeutique ne semblait néanmoins pas permettre de corriger l'hypoargininémie¹⁹⁷.

Perspectives offertes par la citrulline

La citrulline, décrite pour la première fois il y a près de 70 ans à partir de la pastèque *Citrullus lanatus* dont elle tient son nom, est un acide aminé non essentiel ayant un rôle prépondérant dans le métabolisme de l'arginine et du NO. Son utilisation thérapeutique est justifiée par des données récentes de la littérature démontrant un effet de la supplémentation en L-citrulline sur la synthèse de NO. La co-localisation cellulaire des ASS, des ASL et des NOS, permettrait tout d'abord, d'orienter l'utilisation de l'arginine synthétisée *de novo* à partir de la citrulline vers la voie des NOS plutôt que par la voie contrôlée par les arginases. D'autre part, l'importante métabolisation de l'arginine entérale par le foie et l'estomac limite sa biodisponibilité en tant que substrat pour la synthèse de NO alors que la citrulline est bien moins sujette à cette métabolisation. Ces mécanismes sont les raisons évoquées afin d'expliquer comment la citrulline permet une meilleure correction de l'hypoargininémie que l'arginine elle-même^{125,198,199}.

Contrairement à l'arginine ou à l'ornithine, qui induisent des effets secondaires gastro-intestinaux ainsi qu'une diarrhée osmotique à des doses élevées, la citrulline est bien tolérée²⁰⁰. Cette différence est importante car l'absorption intestinale de citrulline ne constitue pas une étape limitante, même à des posologies élevées²⁰¹.

Ces données pharmacologiques ont été retrouvées sur des modèles animaux de traumatisme et de sepsis, représentant ainsi un réel intérêt en réanimation²⁰²⁻²⁰⁴.

C'est pourquoi, dans cette première partie de travail de thèse, nous avons voulu développer un modèle de sepsis qui réponde aux recommandations récemment publiées. Puis, nous avons voulu démontrer qu'une supplémentation en citrulline pouvait restaurer les fonctions lymphocytaires et atténuer l'immunosuppression, notamment en corrigeant les dysfonctions mitochondriales et en augmentant la prolifération des lymphocytes T.

Cependant, l'année 2020 a été marquée par l'émergence du SARS-CoV 2 dont les données cliniques et biologiques initialement rapportées (importance de la lymphopénie) sont proches de celles constatées au cours des sepsis bactériens. Alors que la majorité des laboratoires étaient contraints de drastiquement réduire leurs activités, nous avons rapidement initié un travail de recherche afin d'évaluer la fonction lymphocytaire au cours des formes graves de SARS- CoV2 et une éventuelle association avec les MDSC et l'arginine.

Chapitre VI. Approches immunologiques des infections secondaires au SARS-CoV2

Le spectre des manifestations cliniques causées par ce virus (COVID-19) est étonnamment large et s'étend d'une maladie bénigne (ressemblant à un accès ordinaire de grippe ou même asymptomatique) à une pneumonie²⁰⁵. Ces derniers cas comportent un risque élevé d'évolution vers un SDRA, éventuellement fatal en cas d'aggravation et de défaillance de plusieurs organes²⁰⁶. Ces formes sévères sont caractérisées par d'importantes similitudes avec les sepsis d'origine bactérienne.

6.1) COVID-19 et physiopathologie

La pénétration de ce coronavirus au niveau des voies respiratoires survient grâce à sa protéine de surface (Spike) se fixant aux récepteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2)) des cellules de l'hôte^{207,208}. Au-delà de sa réplication, le virus a un effet toxique direct sur les cellules des voies respiratoires entraînant une mort cellulaire, des lésions tissulaires et une inflammation locale impliquant une myriade de réactions immunitaires (**Figure 14**).

Dans la majorité des cas, le système immunitaire de l'hôte va permettre de contenir la propagation de ces virions. Néanmoins chez certains patients, la réplication virale est trop importante. Cela conduit alors à la diffusion à l'ensemble de l'arbre respiratoire du virus et à la survenue des lésions tissulaires. Une réaction inflammatoire exacerbée, notamment caractérisée par une importante sécrétion de cytokines, va alors survenir dont les conséquences peuvent être mortelles²⁰⁸. Ces constatations ont motivé l'évaluation des mécanismes immunosuppresseurs survenant au cours de ces infections tels que l'exploration de la lymphopénie, le recrutement de cellules immunosuppressives ou encore l'évaluation du profil immuno-métabolique de ces patients.

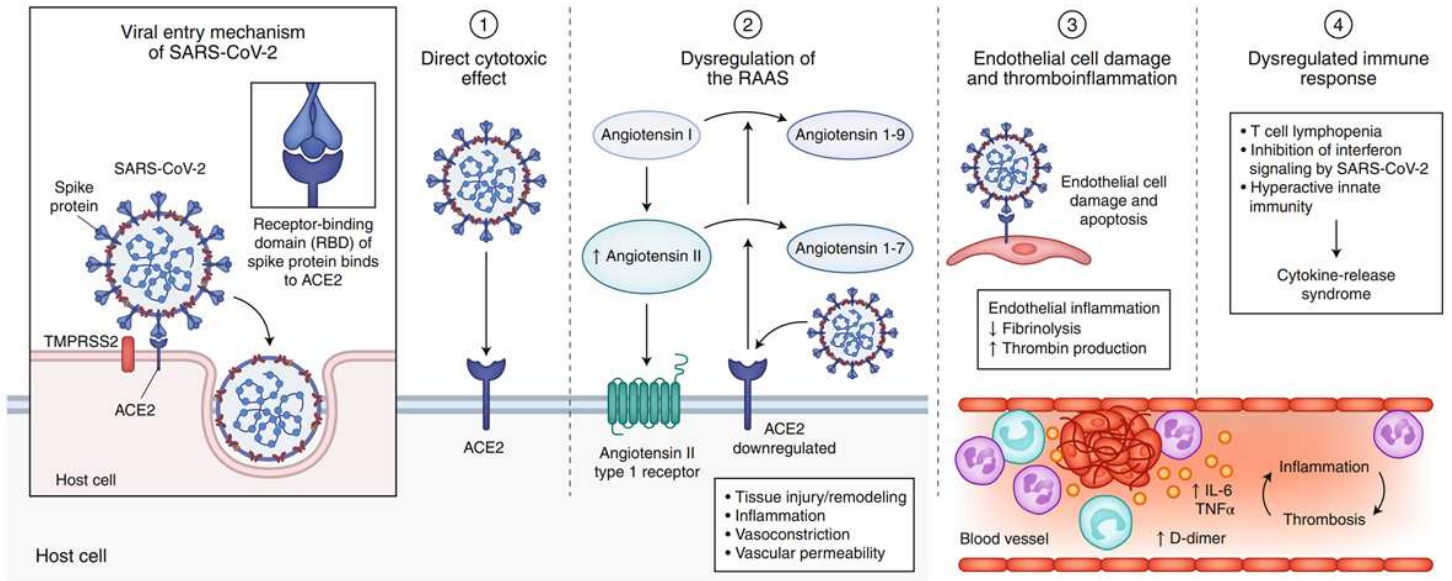


Figure 14. Physiopathologie des infections secondaires au SARS-CoV2.
D'après Gupta et al. ²⁰⁷

Le SARS-CoV-2 pénètre dans les cellules hôtes par l'intermédiaire d'une interaction entre de sa protéine spike et le récepteur ACE2. Les mécanismes des lésions caractéristiques du COVID-19 comprennent (1) des dommages cellulaires directs ; (2) une dérégulation du système rénine angiotensine aldostérone (RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosterone-System) ; (3) des dommages aux cellules endothéliales et une inflammation vasculaire ; et (4) une dérégulation de la réponse immunitaire comportant une hyperinflammation, une inhibition de la signalisation de l'IFN par le virus, une lymphopénie et une production exacerbée de cytokines pro-inflammatoires, en particulier IL-6 et TNF- α .

Les formes graves de SARS-COV2 vont présenter plusieurs caractéristiques proches voire similaires avec un sepsis bactérien telles que :

- Une lymphopénie profonde
- L'expansion de MDSC
- Des perturbation du métabolisme de l'arginine
- Un séjour en réanimation prolongé avec acquisition d'infections secondaires.

6.2) Lymphopénie et COVID-19

Les premières descriptions des patients atteints d'infections à SARS-CoV2 ont permis de dresser aisément un portrait des manifestations clinico-biologiques de ces infections mais également d'identifier les facteurs de risque associés à la survenue de formes sévère^{209,210}. Parmi les anomalies biologiques observées, la mise en évidence d'une lymphopénie profonde touchant particulièrement les populations des lymphocytes T CD8²¹¹ dont la persistance est associée à un assombrissement du pronostic des patients a précocement été décrite ^{209,212,213}.

Les mécanismes évoqués afin d'expliquer cette lymphopénie comprennent :

- Les effets des cytokines. En effet, la lymphopénie semble corrélée aux taux d'IL-6, d'IL-10 et de TNF- α ^{214,215}. Les cytokines telles que le TNF- α ou l'IFN de type II peuvent inhiber la recirculation des lymphocytes T dans le sang en favorisant leur rétention dans les organes lymphoïdes et leur fixation à l'endothélium

- Le recrutement de ces cellules au niveau du site de l'infection peut également réduire la quantité de lymphocytes dans le sang circulant. Les analyses des liquides broncho-alvéolaires des patients atteints de formes sévères objectivaient, en ce sens, une majoration de la proportion de lymphocytes T²¹⁶. Quant aux analyses anatomopathologiques post-mortem, celles-ci confirmaient cette hypothèse en montrant une infiltration lymphocytaire massive des tissus pulmonaires²¹⁷.

- Un renforcement de la mort cellulaire par le biais de l'apoptose lymphocytaire²¹⁸.

Par ailleurs, l'évaluation des lymphocytes de patients atteints de formes sévères a permis d'objectiver la présence fréquente de stigmates d'épuisement (ou exhaustion) tels que l'expression de T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (TIM-3) ou PD-1²¹⁵ ainsi qu'une altération de leurs fonctions²¹⁹.

Des mécanismes faisant intervenir d'autres populations cellulaires telles que les MDSC ont également été étudiés.

6.3) MDSC au cours des infections graves à SARS-COV 2

Parmi les perturbations immunitaires observées au cours du COVID-19, le recrutement dans le sang périphérique de populations immunosuppressives telles que les MDSC a rapidement été objectivé²²⁰. Cette expansion a été décrite pour les M-MDSC ainsi que pour les G-MDSC et apparaissait corrélée avec la sévérité des patients. Une analyse des effets des M-MDSC réalisée par Falck-Jones et *al.*²²¹ a permis de décrire une inhibition de la prolifération et des fonctions des lymphocytes T, notamment de la production d'IFN- γ , médiée par l'activité arginase de ces cellules. La proportion de M-MDSC représentait plus de 90% de l'ensemble des cellules mononuclées circulantes chez les patients sévèrement atteints et décroissait au cours de la guérison. Était également objectivée au cours de cette étude une diminution de l'expression de la chaîne CD3 ζ des lymphocytes T. L'émergence de G-MDSC a également été décrite au cours du COVID-19, là encore préférentiellement chez les patients sévères²²². Ces cellules sont responsables d'une inhibition de la production d'IFN- γ médiée par une production de TGF- β et de iNOS ayant pour conséquence une probable diminution de la clairance virale. D'autres mécanismes immunosuppresseurs exposés dans la **figure 15** participent aux dysfonctions immunitaires observées au cours des formes sévères de COVID-19.

D'autre part, une augmentation marquée des G-MDSC Hexokinase⁺ a été observée exclusivement chez les patients présentant des formes modérées et sévères de COVID-19. L'expression de cette hexokinase implique la survenue de modifications métaboliques pouvant promouvoir l'apoptose lymphocytaire²²³.

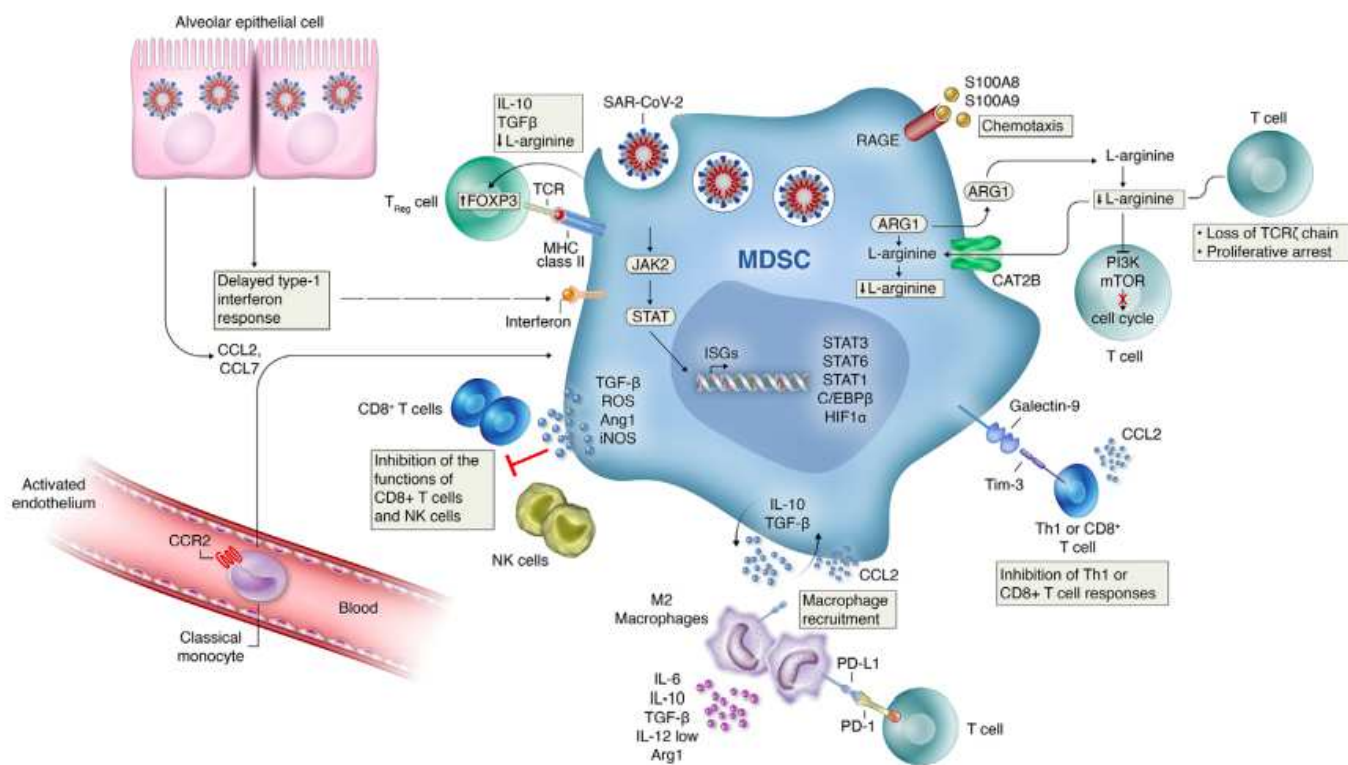


Figure 15. Mécanismes immunosuppresseurs médiés par les MDSC au cours du COVID-19. D'après Rowlands et al.²²⁴

Les mécanismes médiés par les MDSC conduisant à un état d'immunosuppression au cours de ces infections comportent : une sécrétion de TGF β et d'IL-10 induisant une programmation anti-inflammatoire des macrophages résidents (M2) ; une inhibition de la réponse lymphocytaire T par stimulation du récepteur TIM-3 ; la survenue d'une déplétion en arginine liée à une augmentation de l'activité arginase (ARG) par ces cellules et une augmentation de l'induction de lymphocytes T régulateurs.

6.4) Métabolisme de l'arginine

La lymphopénie profonde et persistante ainsi que l'émergence de MDSC associées à une augmentation de l'activité arginase ont questionné cliniciens et scientifiques. La biodisponibilité en arginine est un facteur permettant de faire un lien entre ces constatations et dont l'évaluation permet d'observer la présence d'une hypoargininémie chez l'ensemble des patients, particulièrement prononcée au cours des formes sévères de COVID-19. De plus, un faible rapport L-Arginine/ornithine observé chez les patients COVID-19 indique une élévation de l'activité de l'arginase²²⁵. Ces perturbations suggèrent l'opportunité thérapeutique offerte par la correction de l'hypoargininémie. Un essai clinique contrôlé et randomisé évaluant les effets d'une supplémentation en arginine a ainsi été conduit²²⁶. Cet essai, conduit sur 90 patients (45 patients recevant de l'arginine et 45 autres recevant un placebo), objectiva une diminution du recours à la ventilation mécanique et de la durée d'hospitalisation chez les patients bénéficiant de cette immunonutrition. Cet essai thérapeutique n'offrait, en revanche, aucune évaluation des fonctions immunologiques, du dosage plasmatique de l'arginine ou encore de la survenue d'infections secondaires. Alors que les dysfonctions de ces paramètres, au cours des formes sévères de COVID-19, semblent similaires à celles observées dans le cadre de chocs septiques secondaires à des infections bactériennes comprenant, notamment, une importante incidence d'infections secondaires.

6.5) Infections acquises au cours du COVID-19

Une importante proportion des perturbations observées chez les patients atteints de formes sévères de COVID-19 apparaissent similaires à celles décrites au cours des sepsis causés par des bactéries que ce soit sur un plan clinique, immunologique mais aussi métabolique. Les patients atteints de COVID-19 ont également une forte propension à développer des infections acquises. Ces infections secondaires se présentent préférentiellement sous la forme d'infections pulmonaires chez les patients sous ventilation mécanique (ou Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique, PAVM)²²⁷⁻²²⁹. Les infections sanguines ont également été amplement décrites^{230,231}. Les premières évaluations ont ainsi essentiellement

concerné les infections bactériennes dont l'impact sur le pronostic est désormais établi^{229,232}. D'autres agents infectieux sont fréquemment rencontrés chez les patients atteints de formes sévères de COVID-19 tels que les agents fongiques. Des études de cohortes ont en effet décrit une proportion variant de 14 à 28% de patients en SDRA développant des aspergilloses pulmonaires^{96,233,234}. L'incidence d'infection à mucorales s'est également révélée inhabituellement élevée²³⁵⁻²³⁷.

Ces infections à champignons filamenteux, habituellement observées chez les patients très immunodéprimés, tels que les patients recevant des chimiothérapies, les greffés d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques, suggèrent la présence de phénomènes immunosuppresseurs locaux ou systémiques. Ces phénomènes peuvent également être favorisés par les thérapeutiques initiées (corticoïdes et anti IL-6 principalement^{238,239}) mais également par les mécanismes induits par l'infection à SARS-CoV2, tels que la lymphopénie ou encore les dysfonctions lymphocytaires^{219,240}. Enfin, l'analyse de réactivations virales, notamment des virus de la famille des *herpesviridae*, a bénéficié de descriptions objectivant un important taux de réactivations (Cytomégalovirus, Herpes simplex virus, Epstein-Barr virus)²⁴¹⁻²⁴³.

Objectifs

La conception actuelle du sepsis en tant qu'entité composée concomitamment de réactions inflammatoires et anti-inflammatoires laisse entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques. Afin de cibler au mieux les opportunités offertes, les phases préliminaires nécessaires sont composées d'études expérimentales ainsi que translationnelles. L'articulation de cette thèse en 2 axes distincts a permis d'aborder différents objectifs.

Le premier travail a pour but le développement d'un modèle murin standardisé d'immunodépression post-septique permettant l'évaluation de la susceptibilité aux infections secondaires. Une évaluation du profil immunitaire des sujets septiques a ainsi été réalisée comportant notamment une approche des dysfonctions immunométaboliques (métabolisme de l'arginine) ainsi que l'évaluation des dysfonctions mitochondriales des lymphocytes T. Dans un second temps, les constatations issues de ce modèle ont permis d'envisager la correction des perturbations immunométaboliques et leurs traductions cliniques et immunitaires grâce à une supplémentation nutritionnelle par de la citrulline.

Le second travail s'inscrit dans un projet de recherche translationnelle au cours duquel, à l'aube de la pandémie secondaire au SARS-COV 2, nous avons souhaité explorer les mécanismes immunosuppresseurs responsables de la lymphopénie caractéristiques des formes sévères du COVID-19.

Ce travail de thèse est ainsi constitué de deux articles :

● **Article 1** : Effets bénéfiques de l'administration entérale de citrulline sur le dysfonctionnement mitochondrial des lymphocytes T induites par le sepsis (Proceedings of the National Academy of Sciences. Février 2022)

● **Article 2** : Le SDRA induit par le SARS-CoV-2 est associé à l'expansion de MDSC, au dysfonctionnement des lymphocytes et à un déficit en arginine. (Journal of Clinical Immunology. Avril 2021)

Les thématiques du sepsis, des infections secondaires et de l'immunomonitoring des patients critiques sont profondément ancrées dans le champ des explorations menées au sein du service de Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale du CHU de Rennes ainsi qu'à l'UMR 1236 du laboratoire Suivi Immunologique des Thérapeutiques Innovantes à Rennes. Fort de cet héritage, la survenue de la pandémie liée au SARS-CoV 2 a été propice à l'exploration de ces thématiques donnant lieu à divers articles qui complètent cette thèse. Ces travaux sont présentés chronologiquement, selon leur date de publication, en annexe de ce travail.

➤ Annexe 1: Le Balc'h P, Pinceaux K, Pronier C, Seguin P, Tadié JM, Reizine F. **Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients**. Crit Care. 2020 Aug 28;24(1):530. doi: 10.1186/s13054-020-03252-3. PMID: 32859241; PMCID: PMC7453668.

➤ Annexe 2: Reizine F, Pinceaux K, Lederlin M, Autier B, Guegan H, Gacouin A, Luque-Paz D, Boglione-Kerrien C, Bacle A, Le Daré B, Launey Y, Lesouhaitier M, Painvin B, Camus C, Mansour A, Robert-Gangneux F, Belaz S, Le Tulzo Y, Tadié JM, Maamar A, Gangneux JP. **Influenza- and COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis: Are the Pictures Different?** J Fungi (Basel). 2021 May 15;7(5):388. doi: 10.3390/jof7050388. PMID: 34063556; PMCID: PMC8156373.

➤ Annexe 3: Reizine F, Liard C, Pronier C, Thibault V, Maamar A, Gacouin A, Tadié JM. **Herpesviridae systemic reactivation in patients with COVID-19-associated ARDS**. J Hosp Infect. 2022 Jan;119:189-191. doi: 10.1016/j.jhin.2021.11.007. Epub 2021 Nov 17. PMID: 34800612; PMCID: PMC8596658.

Résultats

Article 1: Sepsis induces early lymphocyte apoptosis through mitochondrial dysfunction and decreases arginine availability: beneficial effects of citrulline enteral administration

Proceedings of the National Academy of Sciences. February 2022

Résumé

Introduction

Les dysfonctions prolongées du système immunitaire au cours d'un sepsis sont associées à un assombrissement du pronostic des patients. Parmi les mécanismes identifiés, la survenue d'une lymphopénie ainsi que le recrutement de cellules immunosuppressives (MDSC) semblent jouer un rôle clé en contribuant notamment à une exacerbation du risque d'acquisition d'infections secondaires. A l'instar des mécanismes immunosuppresseurs responsables d'un échappement tumoral, ces troubles immunologiques semblent médiés par des perturbations du métabolisme de l'arginine.

Méthodes

Un modèle murin de double agressions septiques par ponction ligature cecale (Cecal Ligation and Puncture : CLP) puis par induction d'une pneumopathie à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline a tout d'abord été développé. Ce modèle a pour but de retranscrire le plus fidèlement possible les mécanismes survenant au cours d'un sepsis humain. Ainsi, au-delà de l'agression initiale, les souris bénéficiaient d'une analgésie, d'une réanimation hémodynamique et de l'administration d'antibiotiques. Ce premier groupe de souris a été comparé à un groupe de souris traitées identiquement mais n'ayant pas subi de première agression septique (souris sham). Une évaluation phénotypique des populations cellulaires circulantes a été réalisée afin d'appréhender les mécanismes de l'immunodépression post septique, 5 jours après la réalisation de la CLP. A cette évaluation s'est associée une étude du fonctionnement mitochondrial des lymphocytes T, une analyse de

l'atteinte pulmonaire secondaire au sepsis ainsi qu'une évaluation du profil métabolique des sujets. Enfin la sévérité des infections secondaires a été analysée. Au cours d'une seconde série d'expérimentations, ces analyses ont été répétées après réalisation d'une CLP chez des sujets ayant bénéficié d'une supplémentation entérale par citrulline, ou par arginine ou encore par un placebo isoazoté.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle répondant aux dernières recommandations dédiées aux études précliniques axées sur le sepsis telles que détaillées dans la table suivante.

	Recommandations	Modèle animal développé
Design de l'étude	1. Suivi de la survie	La survie a été évaluée et reflétait l'évolution clinique
	2. Initiation de l'intervention thérapeutique postérieure à l'agression septique	Immunonutrition, réanimation hémodynamique et antibiothérapie initiés après l'agression septique
	3. Fournir autant d'information que possible sur le modèle et la méthodologie	Toutes les informations sont fournies afin de permettre la reproduction du modèle
Modélisation humaine	4. Développement et validation de critères standardisés pour surveiller le bien-être des animaux septiques	Le bien-être a été surveillé à l'aide de critères publiés pour garantir le bien-être des animaux. Ces critères ont été contrôlés quotidiennement
	5. Développement et validation de critères standardisés pour l'euthanasie des animaux septiques	Des critères d'euthanasie ont été élaborés et validés. Ces critères ont été définis dans notre description de modèle lorsqu'elle a été soumise à notre comité institutionnel du bien-être animal.
	6. Analgésie recommandée pour le sepsis secondaires à une intervention chirurgicale conformément aux considérations éthiques	De la buprénorphine était administrée systématiquement et si nécessaire en utilisant un

		score d'évaluation de la douleur
Type d'infection	7. L'utilisation de LPS n'est pas un modèle adapté pour reproduire le sepsis humain.	Le sepsis a été induit par CLP permettant la libération de matières fécales dans la cavité péritonéale pour générer une réponse immunitaire exacerbée dont l'origine est polymicrobienne
	8. Les micro-organismes utilisés dans les modèles animaux doivent de préférence reproduire ceux que l'on trouve couramment dans le sepsis humain	Les espèces de bactéries isolées à partir de souris CLP (sanguines et péritonéales) semblaient être comparables à celles isolées chez l'Homme.
Insuffisance/ Dysfonction d'organes	9. Le dysfonctionnement d'un organe/système est défini comme un écart par rapport à la normale mettant la vie en danger pour cet organe/système sur la base de preuves objectives	L'administration précoce d'antibiotiques et la réanimation liquidienne ont entraîné une nette amélioration de la viabilité, étant donné que 80 % des souris traitées par méropénème ont survécu au moins 5 jours après la CLP, alors que celles sans antibiotiques ont subi une mortalité de 80 % dans les 48 heures.
	10. Il n'est pas nécessaire que toutes les fonctions d'un organe/système individuel soient anormales pour qu'un dysfonctionnement organique soit présent 11. Pour définir des preuves objectives de la gravité du dysfonctionnement d'un organe/système, un système de notation doit être développé, validé et utilisé 12. Toutes les expériences ne doivent pas mesurer tous les paramètres de dysfonctionnement des organes, mais les modèles animaux doivent être pleinement exploités	Notre modèle a étudié l'immunosuppression induite par le sepsis. Le dysfonctionnement immunitaire était donc entièrement surveillé. De plus, la sévérité de l'infection secondaire a été étudiée à l'aide d'approches microbiologiques et histologiques.

Réanimation hémodynamique	<p>13. La réanimation hémodynamique est essentielle</p> <p>14. Administrer la réanimation hémodynamique en fonction des exigences spécifiques du modèle</p> <p>15. Considérez le modèle de sepsis pour l'initiation et la poursuite de la réanimation hémodynamique</p> <p>16. La réanimation est recommandée par l'application de solutions cristalloïdes iso-osmolaires</p>	<p>La réanimation hémodynamique a été utilisée conformément aux directives en utilisant des solutions cristalloïdes iso-osmolaires (250 µL de solution saline à 0,9 % toutes les 24 h pendant 5 jours après la chirurgie)</p>
Antibiothérapie	<p>17. Les antimicrobiens sont recommandés pour les études précliniques évaluant les agents thérapeutiques potentiellement utilisables chez l'humain</p> <p>18. Les antimicrobiens doivent être choisis en fonction du modèle et du pathogène probablement</p> <p>19. L'administration d'antimicrobiens doit imiter la pratique clinique</p>	<p>Des antimicrobiens ont été administrés dans les 24 heures suivant la CLP, choisis en fonction de l'agent pathogène connu (25 mg/kg de méropénème).</p>

Ce modèle nous a permis d'effectuer une caractérisation des fonctions immunitaires comprenant la mise en évidence d'un recrutement de contingents cellulaires immunosuppresseurs tels que les MDSC et les lymphocytes T régulateurs. La survenue d'une première agression septique était également associée à une diminution de l'index de prolifération lymphocytaire, d'un accroissement de l'apoptose lymphocytaire et de la gravité des pneumopathies secondaires (bactériologique et anatomopathologique). Ces perturbations étaient associées à une diminution de la biodisponibilité en arginine ainsi qu'à la présence de dysfonctions des mitochondries des lymphocytes T. A ces perturbations biologiques s'associait également une analyse clinique comprenant notamment une évaluation de l'atteinte pulmonaire (ALI) médiée par le sepsis ainsi qu'une plus importante susceptibilité aux infections secondaires.

Dans un second temps, nous avons évalué les effets d'une correction de l'hypoargininémie induite par le sepsis. La supplémentation nutritionnelle par citrulline a permis de restaurer la concentration plasmatique en arginine de manière efficace entraînant également une diminution du recrutement des MDSC, des lymphocytes T régulateurs et enfin de la proportion de lymphocytes T apoptotiques. L'analyse du fonctionnement mitochondrial et de la capacité à proliférer des lymphocytes T a objectivé une restauration de la capacité à proliférer *in vitro* ainsi que de la respiration mitochondriale. Ce régime immunomodulateur était également associé à une moindre susceptibilité aux pneumopathies secondaires.

Conclusion

Ces résultats soulignent le caractère crucial du métabolisme de l'arginine au sein des dysfonctions immunitaires post-septiques. Les bénéfices observés par l'apport de citrulline permettent d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques au cours du sepsis.



Beneficial effects of citrulline enteral administration on sepsis-induced T cell mitochondrial dysfunction

Florian Reizine^{a,b,c}, Murielle Grégoire^{a,b}, Mathieu Lesouhaitier^{a,b,c}, Valentin Coirier^{a,b,c}, Juliette Gauthier^{a,b}, Céline Delalay^{a,b}, Elise Dessauge^b, Florent Creusat^b, Fabrice Uhel^{a,b,c}, Arnaud Gacouin^{c,d}, Frédéric Dessauge^e, Cécile Le Naoures^f, Caroline Moreau^g, Claude Bendavid^g, Yoann Daniel^h, Kilian Petitjean^h, Valérie Bordeauⁱ, Claire Lamaison^b, Caroline Piau^j, Vincent Cattoir^{j,k}, Mikael Roussel^{a,b}, Bernard Fromenty^h, Christian Michelet^{c,d}, Yves Le Tulzo^{c,d}, Jaroslaw Zmijewski^l, Ronan Thibault^{m,n}, Michel Cogné^{a,b}, Karin Tarte^{a,b}, and Jean-Marc Tadié^{b,c,d,1}

^aLaboratoire Suivi Immunologique des Thérapeutiques Innovantes, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35033 Rennes, France; ^bINSERM, Microenvironnement, Cell Differentiation, Immunology, and Cancer-UMR_S1236, Établissement française du sang Bretagne, Université de Rennes 2, F-35000 Rennes, France; ^cService des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35033 Rennes, France; ^dINSERM, Centre d'Investigation Clinique de Rennes, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35000 Rennes, France; ^ePEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590 Saint Gilles, France; ^fLaboratoire d'anatomie pathologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35033 Rennes, France; ^gLaboratoire de Biochimie, Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35033 Rennes, France; ^hUMR_A 1341, UMR_S 1241, INSERM, Institut de Nutrition, Métabolismes et Cancer, Institut National de Recherche Agronomique, Université de Rennes 2, F-35000 Rennes, France; ⁱBACTERIAL REGULATORY RNAS AND MEDICINE-UMR_S 1230, INSERM, Université de Rennes 2, F-35000 Rennes, France; ^jService de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35033 Rennes, France; ^kCentre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques (Laboratoire associé "Entérocoques"), Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35043 Rennes, France; ^lDepartment of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294; ^mINSERM, Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Nutrition, Institut National de Recherche Agronomique, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35033 Rennes, France; and ⁿINSERM, Institut de Nutrition, Métabolismes et Cancer, Institut National de Recherche Agronomique, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, F-35000 Rennes, France

Edited by Claudia Morris, Department of Pediatrics, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA; received August 17, 2021; accepted December 23, 2021 by Editorial Board Member Carl F. Nathan

Severe sepsis induces a sustained immune dysfunction associated with poor clinical behavior. In particular, lymphopenia along with increased lymphocyte apoptosis and decreased lymphocyte proliferation, enhanced circulating regulatory T cells (Treg), and the emergence of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have all been associated with persistent organ dysfunction, secondary infections, and late mortality. The mechanisms involved in MDSC-mediated T cell dysfunction during sepsis share some features with those described in malignancies such as arginine deprivation. We hypothesized that increasing arginine availability would restore T cell function and decrease sepsis-induced immunosuppression. Using a mouse model of sepsis based on cecal ligation and puncture and secondary pneumonia triggered by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* inoculation, we demonstrated that citrulline administration was more efficient than arginine in increasing arginine plasma levels and restoring T cell mitochondrial function and proliferation while reducing sepsis-induced Treg and MDSC expansion. Because there is no specific therapeutic strategy to restore immune function after sepsis, we believe that our study provides evidence for developing citrulline-based clinical studies in sepsis.

citrulline | sepsis | mitochondria | T cell

Sepsis is a common cause of morbidity and mortality in intensive care units (ICUs) (1). The initial proinflammatory response associated with sepsis is essential for microbiological clearance and involves the activation of the immune system. However, sepsis induces as well a sustained immune dysfunction, also known as immuno-paralysis or immunosuppression, which has been well characterized over the past years through the functional analysis of immune cells and clinical evidences such as high rates of ICU-acquired infections or the reactivation of latent viruses (2, 3). In particular, lymphopenia along with increased lymphocyte apoptosis and decreased lymphocyte proliferation, enhanced circulating regulatory T cells (Treg), and the emergence of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) have all been associated in critically ill septic patients with persistent organ dysfunction such as acute lung injury (ALI), nosocomial infections acquisitions, and poor outcomes (4–6). Although underlying mechanisms in MDSC-associated immunosuppression in severe infection remain to be exhaustively understood,

several data suggest that mechanisms involved in MDSC-mediated T cell dysfunction shared some features with those described in malignancies, including arginase-induced arginine depletion that could be responsible for T cell mitochondrial dysfunction and enhanced apoptosis (7–11). Along these lines, in specific catabolic conditions such as sepsis, de novo arginine synthesis is not sufficient and becomes an essential amino acid. Consequently, sepsis induces an arginine-deficiency state, and arginine deficiency has been associated with an increased incidence of nosocomial infection and mortality (12–15).

Arginine administration in septic patients might thus result in better clinical outcomes. While immune modulating diets containing arginine are conceptually appealing, data from clinical trials and several meta-analyses have failed to produce convincing evidence in sepsis (16). These results have been

Significance

Since sepsis induces a sustained immunosuppression responsible for secondary infections acquisition and late mortality, restoring immune function would result in a better outcome. Given the role of arginine deficiency in T cell dysfunction, the evaluation of restoring arginine availability in sepsis has to be explored. Using an animal model of sepsis, we demonstrated that increasing arginine availability enhanced mitochondrial T cell function and decreased sepsis-induced immunosuppression.

Author contributions: F.R., M.G., C.D., F.D., Y.D., C.P., K.T., and J.-M.T. designed research; F.R., M.G., M.L., V.C., J.G., E.D., F.C., F.D., C.L.N., V.B., and J.-M.T. performed research; F.R., M.G., M.L., C.D., E.D., F.U., A.G., F.D., C.L.N., C.M., C.B., Y.D., K.P., V.B., C.L., C.P., V.C., M.R., B.F., C.M., Y.L.T., J.Z., R.T., M.C., K.T., and J.-M.T. analyzed data; and F.R., V.C., J.Z., M.C., K.T., and J.-M.T. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission. C.M. is a guest editor invited by the Editorial Board.

This article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND).

See online for related content such as Commentaries.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: jeanmarc.tadie@chu-rennes.fr.

This article contains supporting information online at <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2115139119/-DCSupplemental>.

Published February 16, 2022.

confounded by grouping different formulas and different types of patients together, introducing heterogeneity and perhaps masking treatment effects (17, 18). Furthermore, early enteral administration of arginine in critically ill patients mainly enhanced ornithine synthesis, suggesting a preferential use by the arginase pathway, while nitric oxide synthesis was barely stimulated, and immune functions were unaffected (19). Recently, several studies have found that supplementation with citrulline, which is converted in arginine through the activity of argininosuccinate synthase and argininosuccinate lyase and does not undergo first-pass metabolism, was more efficient than arginine to increase the plasma level of arginine (12).

Using a mouse model of sepsis with secondary infection, we aimed to demonstrate that supplementation with citrulline was more efficient than that with arginine to increase systemic arginine availability. We also analyzed in detail how such supplementation could improve T cell function in blood and spleen and alleviate immunosuppression in postsepsis conditions, notably by increasing T cell mitochondrial function and proliferation.

Results

Cecal Ligation and Puncture Induces Immunosuppression and Arginine Depletion. We first evaluated whether a model of cecal ligation and puncture (CLP) rescued by antibiotic treatment could be relevant to address the question of sepsis-related arginine depletion (Fig. 1A). As expected, CLP induced an increase in peripheral blood and spleen T cell apoptosis in vivo and a decrease in T cell capacity to proliferate in vitro in response to stimulation by anti-CD3e/anti-CD28 antibodies, both features classically associated with sepsis-related immune paralysis (Fig. 1B–D). CLP did not impact T cell cycle progression (SI Appendix, Fig. S3A). Lymphocytes are primarily using mitochondria to meet their energetic demands, and their clonal expansion and optimal activation normally associate with a switch to a metabolic phenotype with increased glycolysis and mitochondrial oxygen consumption rate (OCR). An analysis of peripheral blood CD3^{pos} T cell mitochondrial mass by flow cytometry using the MitoTracker Green probe did not find any difference between CLP and sham mice. However, T cells isolated 5 d after CLP exhibited a decrease in maximal mitochondrial OCR compared to T cells from sham mice (Fig. 1E). An analysis of spleen T cells further confirmed the decrease in maximal mitochondrial OCR and revealed a reduced adenosine triphosphate (ATP) production after CLP (Fig. 1F). Moreover, CLP induced an expansion of circulating regulatory T cells and both granulocytic (G-) and myeloid (M-) MDSC at day 5 in the CLP group compared to the sham group (Fig. 1G). Importantly, the plasma levels of arginine and citrulline were significantly lower in the CLP group in association with an increased arginase activity evaluated using the arginine-to-ornithine ratio (Fig. 1H). Of note, CLP induced a significant decrease of CD247/CD3 ζ expression on spleen T cells (SI Appendix, Fig. S3B). Taken together, these data identify our CLP model as appropriate to evaluate immunological consequences of sepsis-induced arginine depletion.

CLP Induces ALI and Worsens the Secondary Infection. Since sepsis is associated with secondary organ dysfunction, we evaluated whether our CLP-induced sepsis was associated with ALI (Fig. 2A). Histological evidence of ALI were found after CLP in mice (Fig. 2B). Since the purpose of this study was to develop a clinically relevant “two-hit” model of sepsis that would reflect delayed mortality because of secondary nosocomial infection, we then performed experiments to demonstrate that sepsis worsened the severity of secondary infection in a model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-induced pneumonia. Bacterial counts performed 12 h after pneumonia

initiation and determined by quantitative cultures of bronchoalveolar lavages (BAL) were higher in CLP mice compared to sham mice (Fig. 2C). Moreover, MRSA systemic dissemination after lung instillation was increased in the CLP group as shown by higher bacterial counts in both spleen and kidneys homogenates (Fig. 2C). The pathological examination of lung tissues 12 h after pneumonia initiation found a higher ALI score in CLP mice compared to sham, with extensive cell infiltration and loss of alveolar structure (Fig. 2D). As expected, survival rates were lower in mice undergoing CLP compared to sham with a mortality of 20.6% (22/107) within the first 5 d following CLP surgery versus 1.8% (2/109) in sham-operated mice ($P < 0.001$, Fig. 2E). Moreover, the mortality related to the secondary pneumonia was also higher in the CLP group compared to the sham group (63.6%, 7/11 versus 0%, 0/12, $P = 0.002$, Fig. 2F). These data highlight the higher severity of MRSA-induced pneumonia in mice surviving CLP.

Citrulline Administration after CLP Increases Plasma Arginine and Restores Immune Function. We then explored the consequences of enteral citrulline administration (150 mg/kg/day for 5 d) on CLP-induced immune dysfunction (Fig. 3A). Citrulline administration after CLP increased significantly both citrulline and arginine plasma levels compared to placebo or arginine administration, whereas arginase activity was not different between the three groups of mice (Fig. 3B). In agreement, the number of Treg was lower in mice receiving citrulline compared to mice receiving arginine or placebo after CLP (Fig. 3C). Furthermore, MDSC subset analysis revealed a significant decrease in M-MDSC number in the citrulline group compared to placebo and arginine groups, while there were no differences between the three groups when analyzing G-MDSC (Fig. 3C). Citrulline administration induced a significant decrease in T cell apoptotic rate in vivo together with an increase in T cell proliferation index under in vitro activation by anti-CD3e/anti-CD28 antibodies (Fig. 3D–F). Conversely, overcoming arginine deficiency did not restore CD247/CD3 ζ expression in T cells nor did it affect their capacity to produce nitric oxide after in vitro stimulation (SI Appendix, Fig. S3B and C). We then evaluated mitochondrial activity in T cells from CLP mice receiving or not receiving arginine or citrulline. Noteworthy, isolated T cells from mice receiving citrulline unlike arginine after CLP had a significantly higher mitochondrial OCR compared to mice receiving the placebo in the absence of the modification of mitochondrial mass (Fig. 3G). When analyzing glycolysis activity, citrulline and arginine restored extracellular acidification rate (ECAR) (SI Appendix, Fig. S4A and B). Citrulline administration also significantly increased ATP production and maximal mitochondrial OCR in spleen T cells (Fig. 3H). Of note, improved mitochondrial function was associated with increased expression of oxidative phosphorylation (OXPHOS) complex subunits in spleen T cells (SI Appendix, Fig. S4C). These data demonstrate that a citrulline-enriched diet efficiently increases the plasma arginine concentration and restores T cell metabolic and proliferative functions after CLP.

Citrulline Administration Decreases CLP-Associated Lung Injury and the Severity of Secondary Infection. Having highlighted the immunological consequences of citrulline administration in septic mice, we next decided to evaluate its clinical impact (Fig. 4A). Lung histological examination revealed that CLP-induced ALI was less severe in mice treated with citrulline, unlike arginine, compared to mice receiving placebo (Fig. 4B). When MRSA pneumonia was induced at day 5 after CLP, lung injury was more pronounced in mice having received placebo or arginine compared to citrulline (Fig. 4C). Additionally, bacteriological cultures of BAL, spleen, and kidney homogenates found a significant decrease in bacterial load in mice receiving the

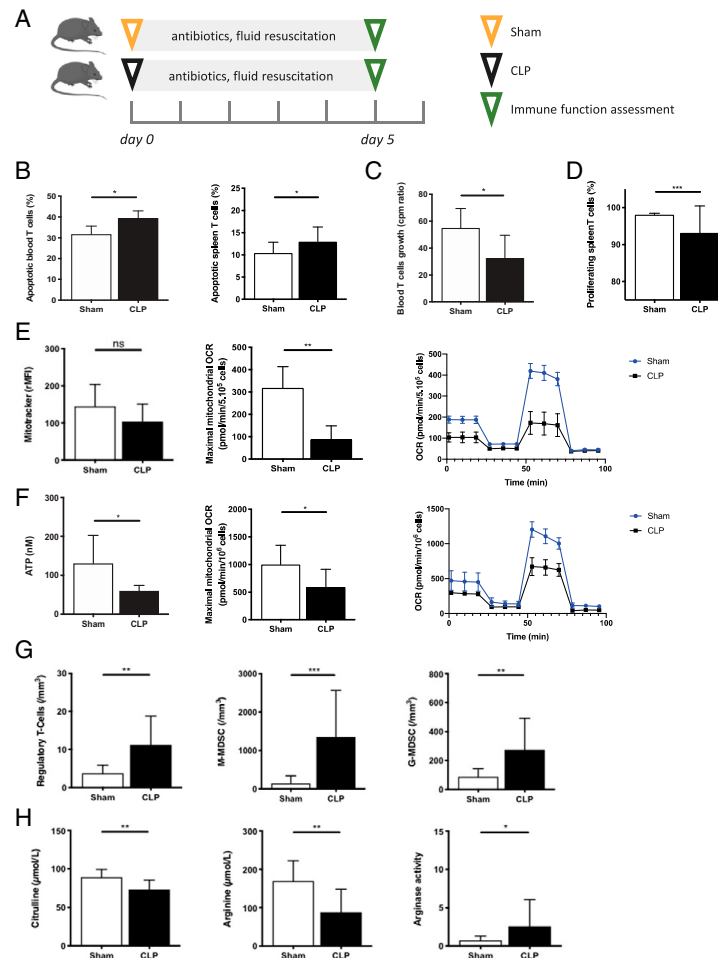


Fig. 1. The impact of sepsis on immune functions, metabolic disturbances, and mitochondrial properties. (A) Animals underwent CLP or sham laparotomy and received antibiotic therapy and fluid resuscitation to create a clinically relevant sepsis model. The immune dysfunction following sepsis was studied 5 d after surgery. (B) T cell apoptosis was assessed by flow cytometry as the percentage of AnnexinVpos/DAPIneg CD3pos cells in peripheral blood (Left; Sham $n = 19$; CLP $n = 20$) and spleen (Right; Sham $n = 11$; CLP $n = 11$). (C) Peripheral blood T cell growth was determined by the incorporation of $[^3H]$ thymidine after 48 h of *in vitro* stimulation by anti-CD3/anti-CD28 antibodies. The data are expressed as the ratios of the counts per minute (cpm) obtained with stimulated versus nonstimulated T cells (Sham $n = 19$; CLP $n = 20$). (D) Spleen T cell proliferation was determined by CFSE dilution under *in vitro* stimulation by anti-CD3/anti-CD28 antibodies. The data are expressed as the proportion (%) of proliferative T cells among living T cells (Sham $n = 11$; CLP $n = 11$). (E) Peripheral blood CD3pos T cell mitochondrial mass was analyzed by flow cytometry using MitoTracker probe (Left; Sham $n = 20$; CLP $n = 11$) while maximal mitochondrial OCR was determined using Seahorse XF-24 extracellular flux analyzer (Right; Sham $n = 5$; CLP $n = 5$). (F) Spleen CD3pos T cell ATP production (Left) and maximal mitochondrial OCR (Right) were defined by CellTiter-Glo Luminescent Cell viability assay and Seahorse XF-24 extracellular flux analyzer, respectively (Sham $n = 7$; CLP $n = 7$). (G) The quantification of Treg (Sham $n = 20$; CLP $n = 13$) and monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC and G-MDSC, Sham $n = 11$; CLP $n = 11$) by flow cytometry within peripheral blood of CLP versus sham mice. (H) Plasma amino acid concentrations were assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Arginase activity was defined by the ornithine-to-arginine ratio (Sham $n = 10$; CLP $n = 14$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: nonsignificant.

citrulline-enriched diet compared to placebo, whereas arginine supplementation was not efficient (Fig. 4D). However, the beneficial effect of citrulline administration on bacterial clearance was not sufficient by itself for significantly extending the CLP survival rate compared to arginine- or placebo-treated mice (S1 Appendix, Fig. S4D).

Discussion

Our study highlights a promising role for citrulline administration during sepsis to restore immune functions through maintaining plasma arginine levels, preserving T cell mitochondrial function, and decreasing the severity of sepsis-associated lung injury and the severity of secondary infection.

Reizine et al.
Beneficial effects of citrulline enteral administration on sepsis-induced T cell mitochondrial dysfunction

PNAS | 3 of 9
<https://doi.org/10.1073/pnas.2115139119>

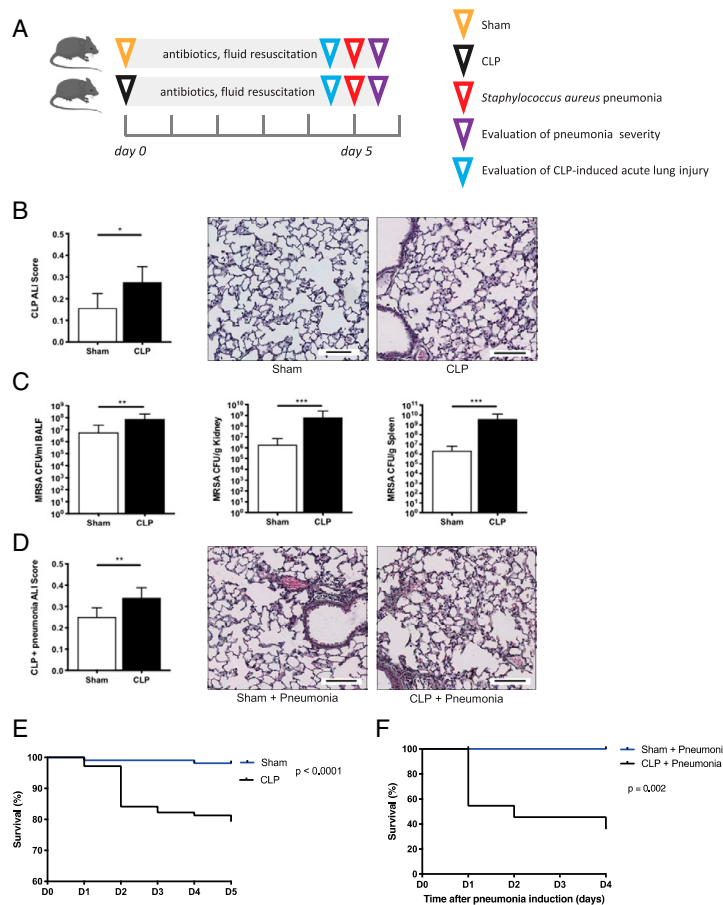


Fig. 2. The impact of CLP on ALI and secondary infection severity. (A) Animals underwent CLP or sham laparotomy and received antibiotic therapy and fluid resuscitation to create a clinically relevant sepsis model. Sepsis-induced ALI was evaluated 5 d after surgery. The second set of experiments studied the severity of a secondary infection following sepsis (MRSA-induced pneumonia). The severity of the secondary infection was evaluated 12 h after pneumonia initiation. (B) The ALI score was determined by pathological examination of lung tissues 5 d after surgery in CLP and sham mice, and representative images of lung tissues show the differences between sham and septic mice (Sham $n = 6$; CLP $n = 6$). (Scale bar, 100 μm .) (C) Bacterial counts were determined 12 h after the tracheal instillation of MRSA in sham and CLP mice by quantitative cultures of BALF (Sham $n = 12$; CLP $n = 9$), spleen, and kidney (Sham $n = 14$; CLP $n = 10$) homogenates for 24 h. (D) The ALI score was determined by pathological examination of lung tissues 12 h after MRSA instillation in mice that underwent CLP or sham procedure (Sham $n = 7$; CLP $n = 7$). (Scale bar, 100 μm .) (E and F) The Kaplan–Meier survival curves of CLP versus sham mice without (Left, Sham $n = 107$; CLP = 109) and with secondary pneumonia induction (Right, Sham $n = 12$; CLP $n = 11$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: nonsignificant.

Although studies in animal models of sepsis have brought several encouraging results, clinical trials failed to provide any evidence for improved survival in critically ill septic patients. These disappointing results have raised doubts about the clinical relevance of such animal models, and numerous limitations have been emphasized to explain discrepancies between animal and human studies (20). Therefore, we first developed a relevant animal model of sepsis following recently published guidelines and demonstrated that our model induced both immunological and clinical markers that have been associated with immunosuppression, nosocomial infection acquisition, and outcome in septic patients (21, 22).

It is well known that sepsis alters both innate and adaptive immunity that is responsible for a high incidence of acquired infection and persistent organ dysfunction (23, 24). In particular, increased T cell apoptosis, decreased T cell proliferation, and MDSC emergence have all been associated with worse outcomes and nosocomial infections (25, 26). We found in our study an increased proportion of circulating MDSC after sepsis that is among the mechanisms involved in acquired immunosuppression. Although suppressive effects of MDSC on T cells are mainly characterized in the tumor microenvironment, several studies have reported that MDSC also impacts T cell function through arginase-1 activity and arginine deprivation

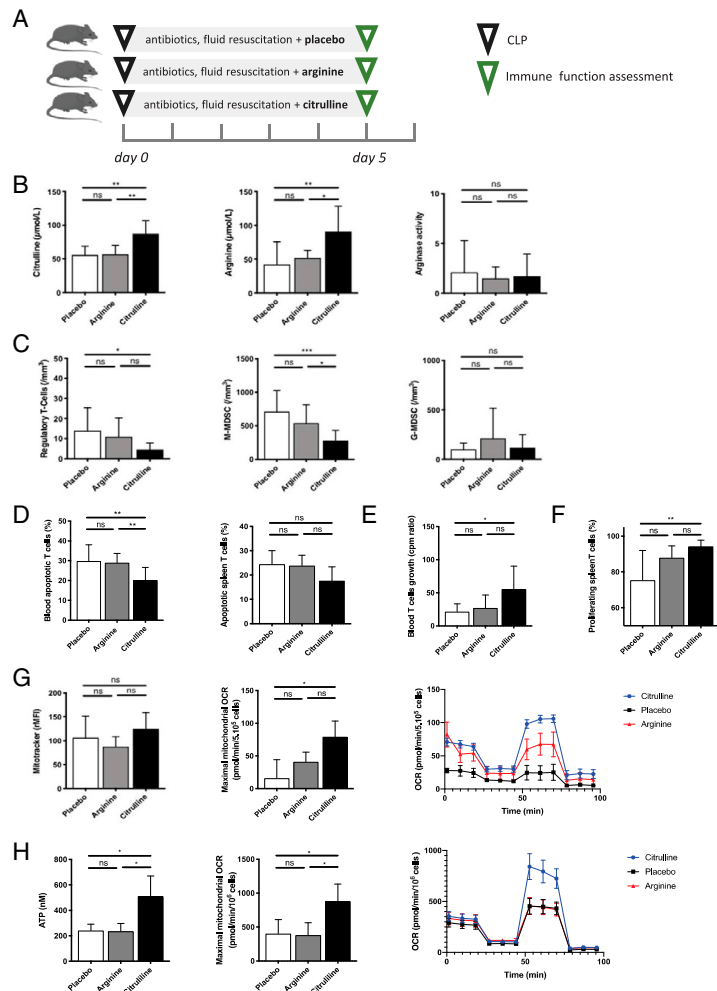


Fig. 3. The effects of citrulline administration on post-septic immunoparalysis and mitochondrial dysfunctions. (A) The animals underwent CLP and received antibiotic therapy and fluid resuscitation. From day 0 to 5, the mice were enterally fed by citrulline (150 mg/kg/day), arginine (150 mg/kg/day), or an isotrogenous placebo. The immune dysfunctions were studied 5 d after surgery. (B) Plasmatic amino acid concentrations were assessed by HPLC. Arginase activity was defined by the ornithine-to-arginine ratio (Sham $n = 10$; CLP $n = 14$) (Placebo $n = 10$, Arginine $n = 13$, and Citrulline $n = 13$). (C) The quantification of Treg and M-MDSC and G-MDSC by flow cytometry within peripheral blood of CLP mice (Placebo $n = 14$, Arginine $n = 12$, and Citrulline $n = 14$). (D) T cell apoptosis was assessed by flow cytometry as the percentage of AnnexinVpos/DAPIneg CD3pos cells in peripheral blood (Placebo $n = 15$, Arginine $n = 15$, and Citrulline $n = 15$) and spleen (Placebo $n = 8$, Arginine $n = 8$, and Citrulline $n = 8$) of CLP mice. (E) Peripheral blood T cell growth was determined by the incorporation of [³H] thymidine after 48 h of *in vitro* stimulation by anti-CD3/anti-CD28 antibodies. The data are expressed as the ratios of the counts per minute (cpm) obtained with stimulated versus nonstimulated T cells (Placebo $n = 6$, Arginine $n = 7$, and Citrulline $n = 12$). (F) Spleen T cell proliferation was determined by CFSE dilution under *in vitro* stimulation by anti-CD3/anti-CD28 antibodies. The data are expressed as the proportion (%) of proliferative T cells among living T cells. (Placebo $n = 8$, Arginine $n = 8$, and Citrulline $n = 8$). (G) Peripheral blood CD3pos T cell mitochondrial mass was analyzed by flow cytometry using MitoTracker probe (Left, Placebo $n = 7$, Arginine $n = 4$, and Citrulline $n = 8$), while maximal mitochondrial OCR was determined using Seahorse XF-24 extracellular flux analyzer (Right, Placebo $n = 4$, Arginine $n = 4$, and Citrulline $n = 4$). (H) Spleen CD3pos T cell ATP production (Left) and maximal mitochondrial OCR (Right) were defined by CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay and Seahorse XF-24 extracellular flux analyzer, respectively (Placebo $n = 7$, Arginine $n = 7$, and Citrulline $n = 7$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: nonsignificant.

in critically ill patients (8, 9, 27). MDSC comprises a heterogeneous population of immature myeloid cells. Two subsets have been described which are both released from the bone

marrow and suppress both adaptive and innate immunity. Although mechanisms responsible for MDSC-mediated immunosuppression in sepsis remain to be exhaustively described,

Reizine et al.
Beneficial effects of citrulline enteral administration on sepsis-induced T cell mitochondrial dysfunction

PNAS | 5 of 9
<https://doi.org/10.1073/pnas.2115139119>

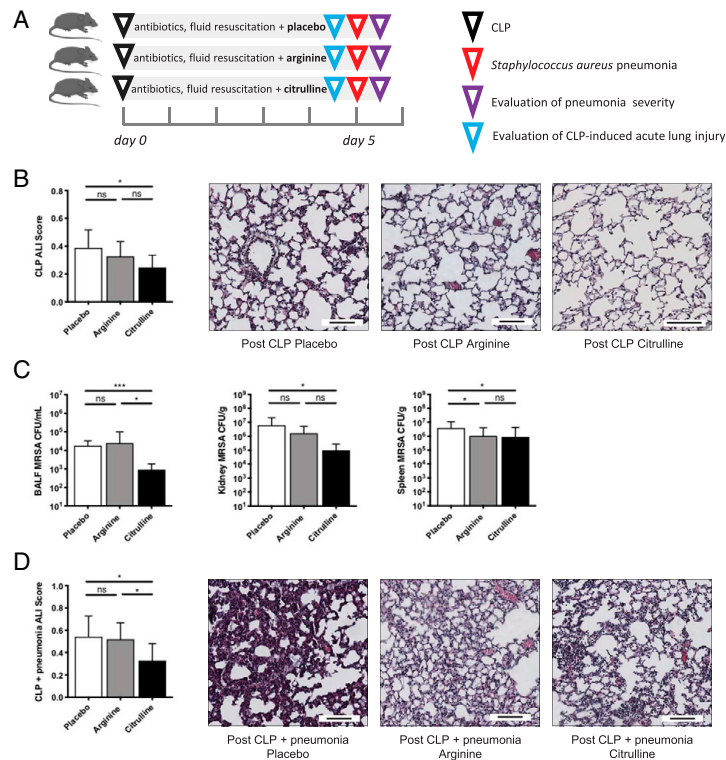


Fig. 4. Citrulline mediated ALI's protection and improvement in secondary infection severity. (A) The animals underwent CLP or sham laparotomy and received antibiotic therapy and fluid resuscitation to create a clinically relevant sepsis model. From day 0 to 5, the mice were enterally fed by citrulline (150 mg/kg/day), arginine (150 mg/kg/day), or an isonitrogenous placebo. Sepsis-induced ALI was evaluated 5 d after surgery. The second set of experiments studied the severity of a secondary infection following sepsis (MRSA-induced pneumonia). The severity of the secondary infection was evaluated 12 h after pneumonia initiation. (B) The ALI score determined by pathological examination of lung tissues 5 d after CLP, and representative images of lung tissues show the differences between the three groups of mice (Placebo $n = 9$, Arginine $n = 7$, and Citrulline $n = 9$) (Sham $n = 6$; CLP $n = 6$). (Scale bar, 100 μm .) The ALI scores were higher in placebo and arginine mice than in citrulline mice. (C) Bacterial counts were determined 12 h after the instillation of MRSA in mice by quantitative cultures of BALF, spleen, and kidney homogenates at 24 h was performed. Bacteriological secondary pneumonia severity assessment showed lower MRSA concentrations in BALF (Placebo $n = 8$, Arginine $n = 13$, and Citrulline $n = 13$), spleen, and kidneys (Placebo $n = 15$, Arginine $n = 21$, and Citrulline $n = 20$) of citrulline-fed mice. (D) The ALI score was determined by the pathological examination of lung tissues 12 h after the secondary infection initiation, and representative images of lung tissues show the differences between the three groups of mice (Placebo $n = 7$, Arginine $n = 8$, and Citrulline $n = 10$). (Scale bar, 100 μm .) The ALI scores were higher in placebo and arginine mice than in citrulline mice. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; ns, nonsignificant.

MDSC-induced arginine depletion through arginase-1 activity has been clearly identified in septic patients. For instance, Uhel et al. found that MDSCs producing arginase-1 were associated with higher mortality and higher incidence of nosocomial infections in patients admitted for septic shock. Additionally, the authors found that the depletion of MDSCs completely abrogated arginase-1 activity and increased both CD4^{POS} and CD8^{POS} T cell proliferation (28).

Arginase converts L-arginine to L-ornithine and urea. In normal conditions, arginine is synthesized de novo and therefore not diet dependent (29, 30). However, enhanced arginase activity during critically ill states is responsible for a significant decrease in arginine availability that becomes essential once endogenous arginine synthesis is exceeded (12). This arginine deficiency strongly contributes to T cell dysfunction. The effects of L-arginine starvation in regulating cell cycle in T cells have

been studied, and growing evidence shows that amino acid availability by tumor cells producing arginase is a mechanism by which tumor cells escape immune response (10, 31). Although the role for arginine metabolism in regulating T cell persistence and survival has been studied in T cell antitumor function, several reports have demonstrated the impact of arginine administration in T cell proliferation during active infection such as severe Covid-19. In sepsis, similar interactions have been found between myeloid cells and T cells with an important impact on the patient's outcome (27, 28, 32).

The shortage of L-arginine inhibits T cell proliferation through several mechanisms such as decreasing the expression of CD3 ζ -chain or inducing blockage in cell cycle progression (33). Furthermore, Geiger et al., using proteomics, metabolomics, and functional approaches, have found that increasing the usage of mitochondrial oxidative metabolism promotes T cell

responses against pathogens (10, 34). Conversely, decreasing L-arginine availability induced a drop in intracellular L-arginine along with altered mitochondrial function highlighted by the significant decrease in the OCR (10). We showed in this study that increasing arginine availability was associated with increased mitochondrial oxidative phosphorylation on the basis of the OCR, along with enhanced proliferation and decreased T cells apoptosis, although we failed to increase the expression of the CD3 ζ -chain. As several studies have shown that mitochondrial energy generation determined the survival and the effectiveness of T cells, our findings are of importance since T cell proliferation inhibition has been associated with worse outcomes in septic shock, and apoptotic cells induce immunosuppression (35). Interestingly, L-arginine starvation could be responsible for T cell proliferation inhibition by inducing the accumulation of MDSCs (29). For instance, Fletcher et al. found that L-arginine deprivation induced the accumulation of MDSCs, which inhibited T cell proliferation in mice (36). These observations are in line with the effect of increasing plasma arginine on the reduction of the circulating M-MDSCs observed in our model. Interestingly, Fletcher et al. also found that de novo synthesis of L-arginine occurs from L-citrulline. In a second step, they compared the efficiency of L-citrulline versus L-arginine supplementation to relieve the proliferation arrest induced by increased arginase-1 activity and found that only L-citrulline restored the proliferation of T cells cultured in the presence of arginase-1.

In humans, it has been demonstrated that L-arginine administration in critically ill patients does not improve immune functions. Conversely, it has been suggested that immunonutrition could be deleterious. These results have been confounded by grouping different formulas and different types of patients together. However, in selected patients such as patients undergoing surgery, immune enhancing diets are beneficial, and specific critically ill patients may benefit from the supplementation of individual immunomodulating nutrients (16, 37). In a previous study, we demonstrated that critically ill states were associated with arginine deficiency and that early enteral administration of L-arginine increased ornithine synthesis, suggesting preferential use by the arginase pathway (19). Citrulline is an amino acid that could be transformed into arginine by the arginine-succinate synthase, and several studies have shown that citrulline supplementation served as an arginine precursor more productively than arginine itself in catabolic situations such as sepsis for several reasons (38). Among those, citrulline is not subject to first-pass metabolism, whereas arginine is largely extracted in the liver, and arginine-succinate synthase colocalizes with nitric oxide synthase (29, 39). Accordingly, in our study, citrulline administration increased arginine plasma levels in septic mice, while arginine did not. Noteworthy, the enteral administration of higher doses of arginine or citrulline such as 300 mg/kg has been found to induce adverse gastrointestinal effects without a significant increase in arginine plasma concentration (40, 41). Since plasma citrulline concentration is the primary factor which determines arginine production by the kidneys, the authors suspected that arginine synthesis was probably saturated when using a high dose of citrulline.

Furthermore, we found that Treg were significantly decreased upon the administration of citrulline. Treg suppress responses of other effector T cell subsets and have been associated with mortality in sepsis. Our results are in accordance with the demonstrated effects of arginine depletion in boosting Treg in vitro as well as in vivo since the depletion of arginine in vitro cell cultures stimulates Treg generation which are unaffected by the arginine-deficiency state (42, 43). Along these lines, Treg metabolism has been shown to be more resistant to sepsis-induced apoptosis. Interestingly, as we found a significant decrease in Treg and M-MDSC in the citrulline-treated group, our findings emphasized the crosstalk between these two types of cells, as it

has been demonstrated that M-MDSCs support the expansion of Treg while Treg modulate M-MDSC differentiation and function (44).

Lastly, we found that citrulline administration could diminish CLP-induced ALI. Sepsis is the leading cause of acute respiratory distress syndrome (ARDS) and accounts for up to 30% of the etiology of ARDS. The crucial role of T cells, mainly CD4^{POS}, to decrease both neutrophils lung infiltration and lung cell apoptosis, two mechanisms that contribute to the development of sepsis-associated lung injury, has been highlighted (45). Furthermore, a strong association between low citrulline levels and the presence of ARDS in sepsis patients suggests that nitric oxide synthase (NOS) substrate deficiency might play a role in the pathogenesis of ARDS (46). Therefore, limiting T cell apoptosis and increasing NOS substrate could be responsible for limiting lung injury after sepsis.

While there is no specific therapeutic strategy to restore or preserve immune function in patients with sepsis and alleviate the risk of acquired infection, we believe that our study provides encouraging evidence to study in detail the potential therapeutic interest of nutrients that impact arginine availability in sepsis. Although results from animal studies should be cautiously translated to humans, the next step should be a clinical trial evaluating the immunologic and clinical impacts of citrulline administration in critically ill septic patients without preexisting immunosuppression.

Materials and Methods

Ethic Statement. All the experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Rennes and by the French Ministry of Education and Research in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Approval Autorisation de Projet Utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques No. 9746-2017042717414943).

Study Design. The first step of our study was to characterize our model of sepsis-induced immunosuppression following recently published recommendations (47–49). For that purpose, we first performed experiments in mice to illustrate sepsis-associated immunosuppression and CLP-induced ALI (Figs. 1A and 2A). Since the purpose of this study was to develop a clinically relevant “two-hit” model of sepsis that would reflect delayed mortality because of secondary nosocomial infection, we then performed experiments to demonstrate that sepsis worsens the severity of secondary infection through a model of MRSA-induced pneumonia (Fig. 2A). Then, we aimed to study the effect of arginine or citrulline enteral administration (150 mg/kg) compared to isotrogenous placebo on sepsis-induced immunosuppression and the severity of secondary infection (Figs. 3A and 4A, respectively).

Recommendations guided CLP-induced sepsis. Animals (C57BL/6J mice [10-wk-old females] purchased from Janvier Labs) underwent CLP or sham laparotomy as already reported (50). In brief, after buprenorphine subcutaneous injection (100 μ g/kg), a midline abdominal incision was made in animals under isoflurane anesthesia. In animals that underwent CLP, the cecum was exposed and ligated in the middle, below the ileocecal valve and punctured once with a 21-gauge needle. A small amount of fecal material was squeezed out of the cecum to induce polymicrobial peritonitis. The cecum was then returned to the abdominal cavity, and the abdominal wall was closed in layers. Antibiotic therapy (25 mg/kg meropenem) was initiated 6 h after CLP or sham surgery and administered by intraperitoneal injection every 24 h for 5 d. Saline for fluid resuscitation was administered to create a more clinically relevant sepsis model, as this is standard care for humans. Buprenorphine for pain relief [based on mouse grimace scale score (51)] was administered within 6 h after CLP. The mice were monitored twice daily to ensure that animal welfare was preserved.

ALI. Histological analysis was performed to assess the occurrence of sepsis-induced ALI. The lungs were harvested 5 d after CLP and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) to perform histologic analysis after hematoxylin and eosin staining. Measurements of histological evidence of ALI (ALI score, *SI Appendix, Fig. S1A*) were performed by a pathologist blinded of mice condition. The histological evidence of ALI was as follows: the accumulation of neutrophils in the alveolar or the interstitial space, the formation of hyaline membranes, the presence of proteinaceous debris in the alveolar space (such as fibrin strands), the thickening of the alveolar wall, and evidence of hemorrhage (52).

Reizine et al.
Beneficial effects of citrulline enteral administration on sepsis-induced
T cell mitochondrial dysfunction

PNAS | 7 of 9
<https://doi.org/10.1073/pnas.2115139119>

Post-sepsis Immune Dysfunction.

Immune parameters. Post-septic immunoparalysis was first assessed by performing biological analysis on the spleen obtained after euthanasia or whole blood that was obtained by direct cardiac puncture under deep anesthesia and placed in a sterile heparinized tube at day 5 after CLP or sham surgery.

Flow cytometry. The quantification of cellular populations was performed on whole blood by using the following antibodies: CD25 (3C7), Ly6G (1A8), CD19 (1D3), CD335 (NKP46), Ter119 (TER-119), CD41 (MWRReg30), CD11b (M1/70), CD11c (HL3), Ly6C (AL-21), CD3e (145-2C11), and CD127 (SB/199) (Becton Dickinson). Erythrocytes were then lysed using Easylyse (Dako). The cells were labeled with Di Aminido Phenyl Indol (DAPI) (Sigma-Aldrich) to exclude dead cells, and precision count beads (BioLegend) were added after staining to calculate the absolute number of cell subpopulations. Gating strategies are displayed in *SJ Appendix, Fig. S2*. A Fortessa x20 flow cytometer (Becton Dickinson) was used to run all samples. The data were analyzed using Kaluza 2.0 software.

Peripheral blood T Cell growth. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by centrifugation using Ficoll (Eurobio) density gradient. The quantification of T cells was obtained by staining PBMC with a CD3e (145-2C11) antibody (Becton Dickinson). A 96-well round-bottom plate was pre-coated with an anti-CD3e (145-2C11, 5 µg/mL, eBioscience) for 2 h at 37 °C. T cells (2.10⁴ cells/well) were added and incubated for 48 h with an anti-CD28 antibody (37.51, 2.5 µg/mL, eBioscience) or complete media for control well in a humidified environment with 5% CO₂ at 37 °C. Then, [³H] thymidine was added in the culture medium (1 µCi/well, PerkinElmer) 16 h before harvesting cells on a fiberglass filter using an automated cell harvester (PerkinElmer). Incorporated radioactivity was measured in a direct beta counter (Top Count, PerkinElmer). The results were expressed as a proliferation ratio between counts per minute measured in stimulated and nonstimulated wells for the same sample.

Splenocyte T cell proliferation. The splenocytes were isolated, mashing spleen with a plunger end of syringe into a 40-µm cell strainer. The erythrocytes were lysed using Easylyse (Dako). The cells were then labeled with 0.2 µM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Intercom). A 96-well round-bottom plate was pre-coated with an anti-CD3e (145-2C11, 5 µg/mL, eBioscience) for 2 h at 37 °C. The T cells (10⁵ cells/well) were added and incubated for 72 h with an anti-CD28 antibody (37.51, 2.5 µg/mL, eBioscience) or complete media for control well in a humidified environment with 5% CO₂ at 37 °C. After 3 d of culture, the cells were harvested and labeled with CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7) antibodies (BD Biosciences), and FV5780 (BD Biosciences) for cell viability. CFSE dilution was assessed by flow cytometry on a Fortessa X-20, and results were analyzed with ModFit LT software.

Amino acid quantification. Citrulline, arginine, and ornithine concentrations were determined by ion-exchange chromatography. Arginase activity was evaluated by measuring the ratio between arginine and ornithine concentrations.

Apoptotic analysis. To evaluate the proportion of apoptotic T cells, whole blood or splenocytes were incubated with CD3e (145-2C11), CD4 (GK1.5), and CD8 (53-6.7) antibodies (Becton Dickinson). The cells were then stained with fluorescein isothiocyanate annexinV (Tau Technologies) and DAPI (Sigma-Aldrich). AnnexinV^{pos}/DAPI^{neg} cells were considered apoptotic.

Mitochondrial Analysis.

Mitochondrial mass. Whole blood was first labeled with a CD3e (145-2C11) antibody, and the erythrocytes were then lysed using Easylyse (Dako). The quantification of mitochondrial mass into T cells was performed using the MitoTracker Green probe (Invitrogen). The cells were incubated for 20 min at 37 °C before washing in phosphate-buffered saline (PBS) and running in a Fortessa x20 flow cytometer (Becton Dickinson).

Mitochondrial function. OCR and ECAR were measured using the Seahorse XF-24 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience). For peripheral T cells, OCR was analyzed after 4 d of PBMC culture into complete media and stimulated with anti CD3e/anti CD28. T cells were purified using Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi). The cells were pooled, counted, and 5.10⁵ cells per well were plated in Seahorse XFe24 cell culture plate (Agilent Technologies) pretreated with poly L-lysine. For spleen T cells, T cells were purified from splenocytes using the Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi) and were seeded at 10⁵ per well. The T cells were incubated for 45 min in a CO₂-free incubator in Seahorse XF Dulbecco's modified Eagle's medium (Agilent Technologies) supplemented with glucose (10 mM, Sigma-Aldrich), sodium pyruvate (1 mM, Life Technologies), and glutamine (2 mM, Life Technologies). Mitochondrial respiration was performed using a Seahorse XF-24 extracellular flux analyzer and the Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies). The cells were treated with oligomycin (2 µM),

carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (2 µM), and Rotenone/Antimycin A (2 µM) at indicated time points.

ATP measurement. Intracellular ATP content was measured using CellTiter-Glo Luminescent Cell viability assay (Promega). Briefly, cells (5.10⁴) were incubated with the CellTiter-Glo reagent for 10 min. Lysate was transferred to an opaque multi-well plate, and luminescent signal was quantified at 540 nm using the Polarstar Omega microplate reader (BMG Labtech). ATP content was calculated using an ATP standard curve.

Cell cycle. The mice were injected with 20 mg 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (Invitrogen) 24 h before euthanasia. The spleens were harvested, perfused with Roswell Park Memorial Institute medium fetal bovine serum-10%, and filtered at 70 µm. The erythrocytes were lysed using Easylyse (Dako), and the cells were washed in PBS BSA-1%. A total of 0.5 × 10⁶ cells were incubated with CD3e antibody (145-2C11, Becton Dickinson) for 20 min at 4 °C. The cells were washed in PBS bovine serum albumin-1% (BSA-1%) and fixed for 15 min at room temperature with Click-iT fixative (Click-iT Plus EdU Flow Cytometry Assay Kit, Life Technologies). The cells were washed in PBS BSA-1% and incubated with Click-iT saponin-based permeabilization and wash reagent and Click-iT Plus reaction mixture for 30 min at room temperature. The cells were washed with Click-iT saponin-based permeabilization and wash reagent. The cells were resuspended in Click-iT saponin-based permeabilization and wash reagent with Dapi at 10 µg/mL and incubated for 20 min at room temperature before running the sample in a Fortessa x20 flow cytometer.

Real-time qPCR. RNA was generated from splenocytes (Macherey-Nagel). Complementary deoxyribonucleic acid synthesis was performed with the SuperScript II reverse transcriptase and random primers (Thermo Fisher Scientific). For qRT-PCR, we used assay-on-demand primers and probes and Taqman Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Gene expression was measured using the StepOnePlus based on the ΔCt calculation method. *B2M* was used as endogenous control (Mm00437762_m1, Thermo Fisher Scientific). For each sample, relative expression to *B2M* were determined for *CD3z* (Mm00446171_m1) and *CD3e* (Mm01179194_m1). The results are then presented as a ratio between *CD3z* and *CD3e* expression levels in order to normalize for CD3 cell frequency between the samples.

NO measurement. To determine the NO concentration, the culture supernatant from PBMC stimulated by anti-CD3/anti-CD28 antibodies for 4 d was collected and centrifuged at 1,500 × g for 10 min and conserved at -20 °C until use. According to the manufacturer's instructions, supernatants were quantified for nitrates by using the nitric oxide assay kit (Thermo Fisher Scientific).

Western blot analysis. The proteins were extracted from pelleted T cells using the radioimmunoprecipitation assay extraction reagent (Fisher Scientific). The soluble protein fraction was collected after centrifugation at 14,000 × g for 20 min (4 °C), and protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid Protein Assay Kit (Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The lysates were combined with sample buffer (50 mM Tris HCl [pH 6.8], 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% bromophenol blue, 20% glycerol, and 0.1 M dithiothreitol), and resolved using SDS-PAGE. Equal amounts of protein (10 µg) were separated on 4 to 12% NuPage gradient gels (Fisher Scientific) via SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) and transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride membranes (Amersham) in N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid buffer (Fisher Scientific) at 100 V for 90 min. A set of prestained molecular mass standards (protein ladder) was run into each gel. The membranes were incubated with blocking solution (5% blotting grade blocker; Bio-Rad) dissolved in Tris-buffered saline-Tween buffer (50 mM Tris HCl [pH 8.6], 150 mM NaCl, and 0.1% Tween) for 60 min. These membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: Total OXPHOS Rodent Western Blot Antibody Mixture (ab110413, Abcam) and β-actin (A5441, Sigma). They were also incubated with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase used at 1:2,500. The horseradish peroxidase chemiluminescence was visualized using an enhanced chemiluminescence kit and the ImageQuant LAS4000 Biomolecular Imager digital imaging system (GE Healthcare). The images generated as gel files were analyzed using the corresponding ImageQuant TL software (GE Healthcare).

Secondary Infection Following CLP-induced Sepsis. The surviving mice were anesthetized with isoflurane and held vertically by holding their upper incisor teeth 5 d after CLP or sham surgery. The tongue was gently extended, and a solution of 50 µL containing 5.10⁷ colony forming unit MRSA strain (National Collection of Type Cultures 12493) was slowly delivered above the trachea. MRSA was selected because it is a gram-positive bacterium resistant to meropenem that is commonly responsible for nosocomial pneumonia that mainly occurs within the first week of hospitalization (53).

Bacterial dissemination. The mice were sacrificed by CO₂ inhalation 12 h after the induction of pneumonia. BAL was performed, as already reported, by cannulating the trachea and lavaging the lungs with 1 mL sterile saline, about 800 μ L BAL fluid was recovered from each mouse (54). The spleen and kidneys were harvested by sterile technique, weighed, and homogenized with a sterile tissue grinder (Ultrathurax). Viable bacterial counts were determined in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), kidneys, and spleen after being seeded on tryptic soy agar plates (Oxoid) and incubated at 35 °C under aerobic conditions. MRSA colonies were counted after 24 h incubation. Growth was calculated as colony-forming units/mL for BAL or as colony-forming units/g for kidneys and spleen. The severity of pneumonia was quantified using All score of lungs fixed with PFA 4% and harvested to perform a histologic analysis of hematoxylin and eosin stained lung specimens (52). A survival study of mice within 4 d following pneumonia initiation was performed.

Statistical Analysis. All data were analyzed with GraphPad Prism 9. Differences among groups in flow cytometric analyses were evaluated by Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis tests as appropriate. The log-rank test was used for comparing survival data. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

Data Availability. All study data are included in the article and/or *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by funding from the Société de Réanimation de Langue Française (SRLF, Bourses Master 2 SRLF). We also thank the animal house Animalerie Rennaise Centre d'Hébergement et d'Expérimentation (ARCHE) platform and H2P2 platform (Structure Fédérative de Recherche [SFR] Biosit), and Aude Bodin for her help with mitochondrial functions analysis.

- D. C. Angus, T. van der Poll, Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013).
- M. J. Delano, P. A. Ward, Sepsis-induced immune dysfunction: Can immune therapies reduce mortality? *J. Clin. Invest.* **126**, 23–31 (2016).
- C. F. Benjamin, C. M. Hogaboam, S. L. Kunkel, The chronic consequences of severe sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 408–412 (2004).
- F. Daviaud *et al.*, Timing and causes of death in septic shock. *Ann. Intensive Care* **5**, 16 (2015).
- F. Venet, G. Monneret, Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* **14**, 121–137 (2018).
- J. S. Boomer *et al.*, Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* **306**, 2594–2605 (2011).
- D. I. Gabrilovich, S. Nagaraj, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162–174 (2009).
- F. Veglia, M. Perego, D. Gabrilovich, Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* **19**, 108–119 (2018).
- E. J. Wherry, T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
- R. Geiger *et al.*, L-Arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell* **167**, 829–842.e13 (2016).
- P. Raber, A. C. Ochoa, P. C. Rodriguez, Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: Mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunol. Invest.* **41**, 614–634 (2012).
- K. A. Wijndants, T. M. Castermans, M. P. Hommen, D. M. Meesters, M. Poeze, Arginine and citrulline and the immune response in sepsis. *Nutrients* **7**, 1426–1463 (2015).
- J. M. Tadié *et al.*, Prediction of nosocomial infection acquisition in ventilated patients by nasal nitric oxide: Proof-of-concept study. *Shock* **34**, 217–221 (2010).
- V. Bronte, P. Zanovello, Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 641–654 (2005).
- A. Gey *et al.*, Granulocytic myeloid-derived suppressor cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill patients. *Clin. Exp. Immunol.* **180**, 280–288 (2015).
- T. W. Rice, Immunonutrition in critical illness: Limited benefit, potential harm. *JAMA* **312**, 490–491 (2014).
- A. R. van Zanten *et al.*, High-protein enteral nutrition enriched with immunomodulating nutrients vs standard high-protein enteral nutrition and nosocomial infections in the ICU: A randomized clinical trial. *JAMA* **312**, 514–524 (2014).
- G. Bertolini *et al.*, Early enteral immunonutrition in patients with severe sepsis: Results of an interim analysis of a randomized multicentre clinical trial. *Intensive Care Med.* **29**, 834–840 (2003).
- J. M. Tadié *et al.*, Arginine administration to critically ill patients with a low nitric oxide fraction in the airways: A pilot study. *Intensive Care Med.* **39**, 1663–1665 (2013).
- M. Bara, A. R. Joffe, The methodological quality of animal research in critical care: The public face of science. *Ann. Intensive Care* **4**, 26 (2014).
- M. F. Osuchowski *et al.*, Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTIPSS): An international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. *Shock* **50**, 377–380 (2018).
- C. S. Deutschman, Translational research: The model matters. *Crit. Care Med.* **46**, 835–837 (2018).
- J. C. Mira *et al.*, Sepsis pathophysiology, chronic critical illness, and persistent inflammation-immunosuppression and catabolism syndrome. *Crit. Care Med.* **45**, 253–262 (2017).
- F. Pène, P. Pickkers, R. S. Hotchkiss, Is this critically ill patient immunocompromised? *Intensive Care Med.* **42**, 1051–1054 (2016).
- Y. Le Tulzo *et al.*, Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* **18**, 487–494 (2002).
- C. Cao, M. Yu, Y. Chai, Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. *Cell Death Dis.* **10**, 782 (2019).
- F. Reizine *et al.*, SARS-CoV-2-induced ARDS associates with MDSC expansion, lymphocyte dysfunction, and arginine shortage. *J. Clin. Immunol.* **41**, 515–525 (2021).
- F. Uhel *et al.*, Early expansion of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells predicts development of nosocomial infections in patients with sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 315–327 (2017).
- R. W. Caldwell, P. C. Rodriguez, H. A. Toque, S. P. Narayanan, R. B. Caldwell, Arginase: A multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiol. Rev.* **98**, 641–665 (2018).
- S. M. Morris Jr., Arginine metabolism revisited. *J. Nutr.* **146**, 2579S–2586S (2016).
- D. S. Thommen, T. N. Schumacher, T cell dysfunction in cancer. *Cancer Cell* **33**, 547–562 (2018).
- X. Zhu *et al.*, The central role of arginine catabolism in T-cell dysfunction and increased susceptibility to infection after physical injury. *Ann. Surg.* **259**, 171–178 (2014).
- P. C. Rodriguez, D. G. Quiceno, A. C. Ochoa, L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* **109**, 1568–1573 (2007).
- E. L. Mills, B. Kelly, L. A. J. O'Neill, Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat. Immunol.* **18**, 488–498 (2017).
- C. Guignant *et al.*, Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care* **15**, R99 (2011).
- M. Fletcher *et al.*, L-Arginine depletion blunts antitumor T-cell responses by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* **75**, 275–283 (2015).
- R. Tepaske *et al.*, Effect of preoperative oral immune-enhancing nutritional supplement on patients at high risk of infection after cardiac surgery: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **358**, 696–701 (2001).
- U. Agarwal, I. C. Didelija, Y. Yuan, X. Wang, J. C. Marini, Supplemental citrulline is more efficient than arginine in increasing systemic arginine availability in mice. *J. Nutr.* **147**, 596–602 (2017).
- P. C. Rodriguez, A. C. Ochoa, A. A. Al-Khami, Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Front. Immunol.* **8**, 93 (2017).
- G. K. Grimble, Adverse gastrointestinal effects of arginine and related amino acids. *J. Nutr.* **137**, 1693S–1701S (2007).
- C. Moinard *et al.*, Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: The Citrulline pharmacokinetic study. *Br. J. Nutr.* **99**, 855–862 (2008).
- R. W. M. Kempkes, I. Joosten, H. J. P. M. Koenen, X. He, Metabolic pathways involved in regulatory T cell functionality. *Front. Immunol.* **10**, 2839 (2019).
- S. P. Cobbold *et al.*, Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 12055–12060 (2009).
- C. R. Lee *et al.*, Myeloid-derived suppressor cells are controlled by regulatory T cells via TGF- β during murine colitis. *Cell Rep.* **17**, 3219–3232 (2016).
- F. Venet *et al.*, Lymphocytes in the development of lung inflammation: A role for regulatory CD4+ T cells in indirect pulmonary lung injury. *J. Immunol.* **183**, 3472–3480 (2009).
- L. B. Ware *et al.*, Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit. Care* **17**, R10 (2013).
- B. Zingarelli *et al.*, Part I: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTIPSS) for study design and humane modeling endpoints. *Shock* **51**, 10–22 (2018).
- C. Libert *et al.*, Part II: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTIPSS) for Types of infections and organ dysfunction endpoints. *Shock* **51**, 23–32 (2018).
- J. Hellman *et al.*, Part III: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTIPSS) for fluid resuscitation and antimicrobial therapy endpoints. *Shock* **51**, 33–43 (2018).
- M. Grégoire *et al.*, Frontline Science: HMGB1 induces neutrophil dysfunction in experimental sepsis and in patients who survive septic shock. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 1281–1287 (2017).
- O. Huet *et al.*, Ensuring animal welfare while meeting scientific aims using a murine pneumonia model of septic shock. *Shock* **39**, 488–494 (2013).
- G. Matute-Bello *et al.*, Acute Lung Injury in Animals Study Group, An official American Thoracic Society workshop report: Features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 725–738 (2011).
- J. Chastre, J. Y. Fagon, Ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 867–903 (2002).
- J. M. Tadié *et al.*, HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **304**, L342–L349 (2013).

Reizine *et al.*
Beneficial effects of citrulline enteral administration on sepsis-induced
T cell mitochondrial dysfunction

PNAS | 9 of 9
<https://doi.org/10.1073/pnas.2115139119>

Supplementary Information for

Beneficial effects of citrulline enteral administration on sepsis induced T-cell mitochondrial dysfunction

Florian Reizine^{1,2,3}, Murielle Grégoire^{1,2}, Mathieu Lesouhaitier^{1,2,3}, Valentin Coirier^{1,2,3}, Juliette Gauthier^{1,2}, Céline Delalay^{1,2}, Elise Dessauge², Florent Creusat⁴, Fabrice Uhel^{1,2,3}, Arnaud Gacouin^{3,4}, Frédéric Dessauge⁵, Cécile Le Naoures⁶, Caroline Moreau⁷, Claude Bendavid⁸, Yoann Daniel⁹, Kilian Petitjean⁶, Valérie Bordeau⁹, Claire Lamaison², Caroline Piau¹⁰, Vincent Cattoir^{10,13,14}, Mikael Roussel^{1,2}, Bernard Fromenty⁸, Christian Michelet¹⁴, Yves Le Tulzo¹⁴, Jaroslaw Zmijewski¹¹, Ronan Thibault⁹, Michel Cogné^{1,2}, Karin Tarte^{1,2} and Jean-Marc Tadié^{2,3,4,*}

¹CHU Rennes, SITI laboratory, F-35033 Rennes, France

²Univ Rennes, INSERM, EFS Bretagne, MICMAC-UMR_S1236, F-35000 Rennes, France

³CHU Rennes, Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, F-35033 Rennes, France

⁴Univ Rennes, CHU Rennes, INSERM, CIC 1414, F-35000 Rennes, France

⁵Univ Rennes, Inra, INSERM, NUMECAN-UMR_S 1241, F-35000 Rennes, France.

⁶CHU Rennes, Laboratoire d'anatomie pathologie, F-35033 Rennes, France

⁷CHU Rennes, Laboratoire de Biochimie, Pôle Biologie, F-35033 Rennes, France;

⁸INSERM, Univ Rennes, INRAE, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer) UMR_A 1341, UMR_S 1241, F-35000 Rennes, France

⁹Univ Rennes, INSERM, BRM-UMR_S 1230, F-35000 Rennes, France

¹⁰CHU Rennes, Service de Bactériologie, F-35033 Rennes, France

¹¹Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA.

¹²Univ Rennes, INSERM, CHU Rennes, Service d'endocrinologie-Diabétologie-Nutrition, INRAE, Nutrition Métabolismes et Cancer, NuMeCan

¹³CHU de Rennes, CNR de la Résistance aux Antibiotiques (laboratoire associé 'Entérocoques'), F-35043 Rennes, France

¹⁴Université de Rennes 1, INSERM, BRM-UMR_S1230, F-35043 Rennes, France

*Address for reprint requests and other correspondence: JM Tadié, Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Hôpital Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex 9, France.

Email: jeanmarc.tadie@chu-rennes.fr

This PDF file includes:
Figures S1 to S4

SI FIGURE LEGENDS

Fig. S1.

Lung Injury Scoring System

Fig. S2.

Gating strategy for the identification of mouse cell subsets (regulatory T-cells, neutrophils, monocytes, M-MDSC and G-MDSC) in whole blood. Doublets and dead cells (Dapi^{pos}) were excluded before backgating of CD19/CD335/Ter119/CD41^{pos} cells (Lin). Regulatory T-cells were gated on Lin^{neg}CD3^{pos} cells as CD25^{pos} and CD127^{neg}. Neutrophils were defined as Lin^{neg}Ly-6G^{pos}. Monocytes as Lin^{neg}Ly-6G^{neg}/CD11b^{pos}/CD11c^{neg}. MDSC subsets were defined on Lin^{neg} and CD11b^{pos} after elimination of neutrophils and monocytes and based on Ly-6C and Ly-6G expression.

Fig. S3.

(A) Flow cytometry analysis of spleen T-cells cell cycle shows that CLP does not induce modification in cell cycle to compare with sham mice (n=14).

(B) Expression of *CD247/CD3z* was determined by Q-PCR on purified spleen T cells. Results are presented as the ratio between *CD3z* and *CD3e* expression in order to normalize the data for the CD3^{pos} cell frequency (Sham n=6; CLP n=6; Placebo n=6; Arginine n=6; Citrulline n=6).

(C) Nitric Oxide concentrations were measured using the Griess reaction in the culture supernatants of peripheral PBMC stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Sham n=12; CLP n=12; Placebo n=9; Arginine n=9; Citrulline n=9)

* p<.05

Fig. S4.

(A) Extracellular acidification rate (ECAR) was measured in peripheral blood CD3^{pos} T-cells (Sham n=5; CLP n=5; Placebo n=4; Arginine n=4 and Citrulline n=4).

(B) ECAR analysis of spleen T-cells (Sham n=7; CLP n=7; Placebo n=7; Arginine n=7 and Citrulline n=7).

(C) Western Blot analysis of OXPHOS-related proteins in purified spleen T-cells (Placebo n=8, Arginine n=8, and Citrulline n=8).

(D) Kaplan-Meier survival curves. Survival proportions were respectively of 85.5% (100/117), 84.7% (100/118), and 91.5% (108/118) for placebo arginine and citrulline treated mice.

* p<.05

Figure S1

Score per field			
Parameter	0	1	2
1. Neutrophils in the alveolar space	none	1-5	>5
2. Neutrophils in the interstitial space	none	1-5	>5
3. Hyaline membranes	none	1	>1
4. Proteinaceous debris filling the airspaces	none	1	>1
5. Alveolar septal thickening	<2x	2x-4x	>4x

$$\text{Score} = [(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)] / (\text{number of fields} \times 100)$$

Figure S2

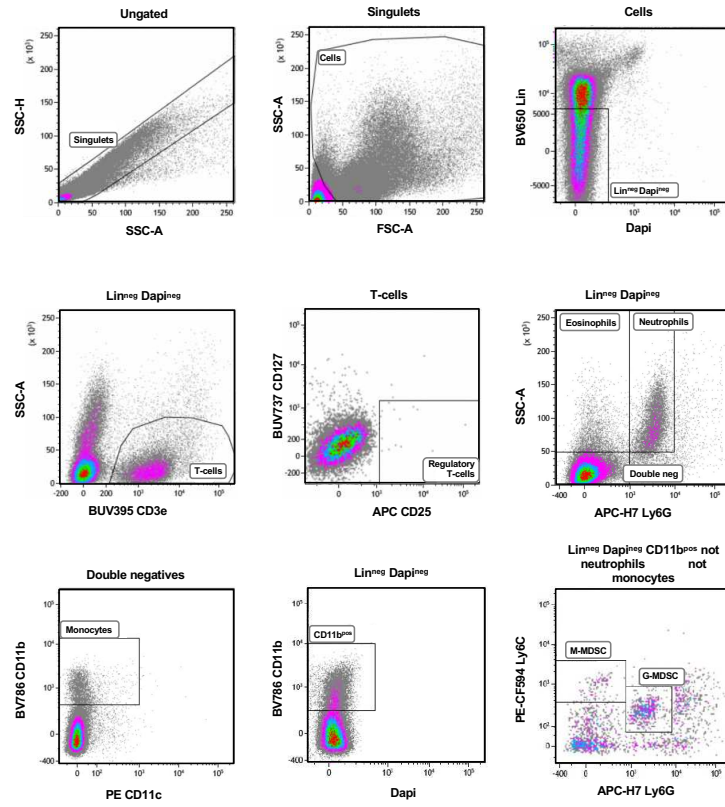


Figure S3

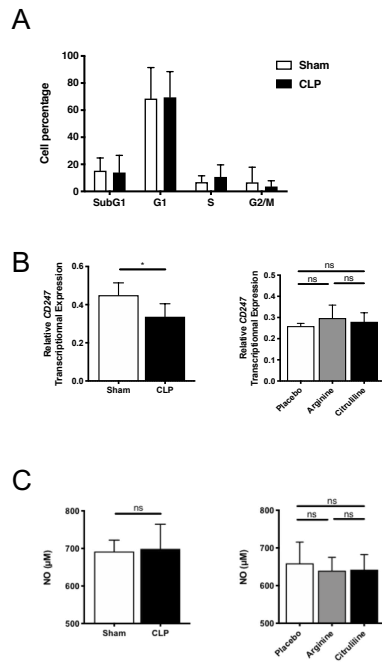
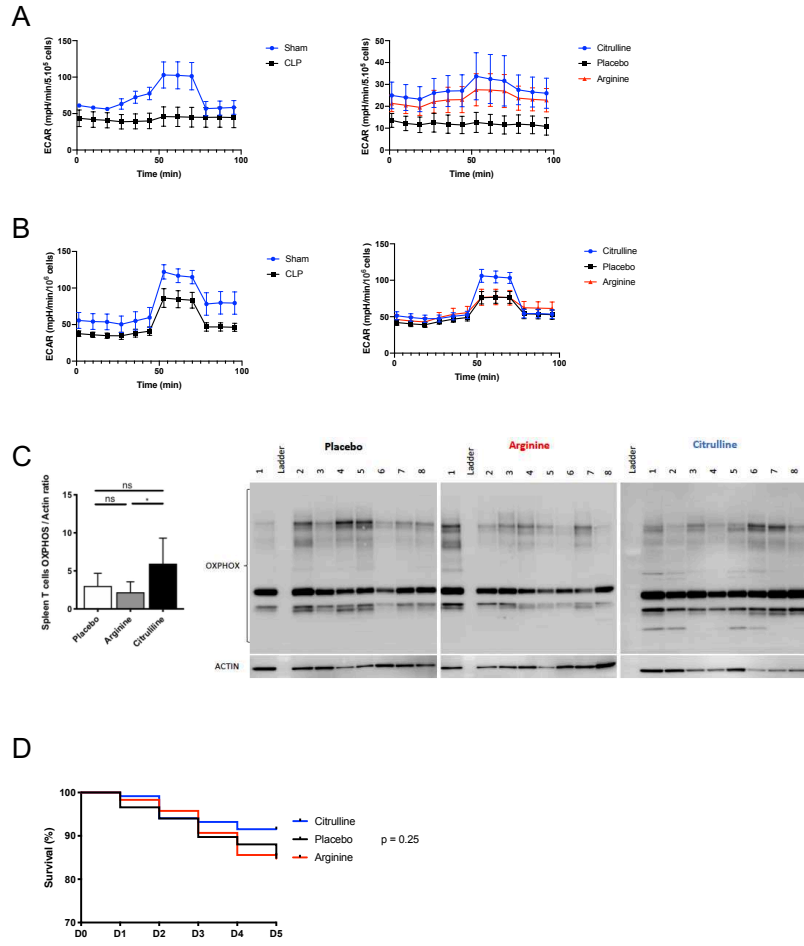


Figure S4



Article 2: SARS-CoV-2-Induced ARDS Associates with MDSC Expansion, Lymphocyte Dysfunction, and Arginine Shortage

Journal of Clinical Immunology. April 2021

Résumé

Introduction.

L'essor des infections liées au coronavirus SARS-COV2 depuis janvier 2020 a bouleversé le paysage sanitaire mondial. Le spectre des manifestations cliniques causées par ce virus (COVID-19) est étonnamment large et s'étend d'une maladie bénigne (ressemblant à un accès ordinaire de grippe ou même asymptomatique) à une pneumonie. Ces derniers cas comportent un risque élevé d'évolution vers le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), éventuellement fatal en cas d'aggravation et de défaillance de plusieurs organes en raison de la survenue d'infections secondaires (bactériennes, fongiques ou encore virales). Les patients atteints de SDRA secondaires à ces infections virales semblent partager des caractéristiques clinico-biologiques avec les chocs septiques d'origine bactérienne telles qu'une lymphopénie profonde et précoce ainsi qu'une susceptibilité accrue aux infections secondaires. Parmi les anomalies biologiques observées au cours des infections sévères à SARS-CoV2, la mise en évidence d'une lymphopénie profonde dont la persistance est associée à un assombrissement du pronostic des patients a précocement été décrite. Cette carence des lymphocytes T pourrait perturber la réponse immunitaire chez certains patients, créant des brèches dans des populations précises de cellules immunitaires, dans la dynamique d'activation de la réponse à l'infection, et dans le répertoire immunitaire que notre organisme utilise et enrichit en permanence pour se défendre. L'exploration des mécanismes responsables de la survenue d'une diminution des lymphocytes a été le premier axe du projet COAL (COVID-19 Associated Lymphopenia).

Méthodes.

Les caractéristiques cliniques et immunologiques de 26 patients atteints de COVID-19 (13 patients en SDRA et 13 patients présentant une pneumopathie sans critère de gravité) ont été analysées et comparées à 13 donneurs sains. Ces patients étaient indemnes d'immunodépression préalable et homogènes en termes d'âges, de sexe et de comorbidités. Les analyses réalisées ont compris des évaluations cliniques, radiologiques ainsi qu'immunologiques (phénotype des lymphocytes T par cytométrie de flux, quantification plasmatique en cytokines et en acides aminés) ainsi qu'une analyse selon la survenue d'infections nosocomiales.

Résultats.


Nous avons révélé qu'en l'absence de différence en termes de paramètres démographiques ou d'antécédents médicaux entre les deux groupes (soulignant l'homogénéité des patients atteints de COVID-19), les patients atteints de SDRA présentaient un nombre accru de cellules suppressives dérivées des myéloïdes (Myeloids Derived Suppressor Cells : MDSC) et un nombre réduit de lymphocytes T CD8 effecteurs mémoires par rapport aux patients hospitalisés pour une pneumonie modérée au COVID-19. Par ailleurs, l'expansion des MDSC secondaire à cette infection sévère était directement corrélée à la lymphopénie et à une augmentation de l'activité arginase. La lymphopénie était également corrélée à une diminution de la biodisponibilité en arginine. La capacité de prolifération des lymphocytes T *in vitro* apparaissait considérablement réduite chez les patients atteints de COVID-19 et semblait restaurée par une supplémentation en arginine. Enfin, la lymphopénie, ainsi que le recrutement de M-MDSC, étaient associés à la survenue d'infections nosocomiales. Ces caractéristiques biologiques soulignent le caractère « sepsis-like » des formes sévères de COVID-19.

Conclusion.

Cette étude souligne le rôle critique du recrutement des MDSC dans le SDRA secondaire aux infections à SARS-CoV 2. Ces résultats permettent d'envisager les perspectives thérapeutiques offertes par une supplémentation en arginine comme traitement adjuvant chez les patients de réanimation. La correction de l'hypoargininémie afin de réduire l'immunosuppression et de favoriser l'élimination du virus pourrait permettre une diminution de la durée de la ventilation mécanique, l'acquisition d'infections nosocomiales et la mortalité.



SARS-CoV-2-Induced ARDS Associates with MDSC Expansion, Lymphocyte Dysfunction, and Arginine Shortage

Florian Reizine^{1,2,3} · Mathieu Lesouhaitier^{1,2,3} · Murielle Gregoire^{2,3} · Kieran Pinceaux¹ · Arnaud Gacouin¹ · Adel Maamar¹ · Benoit Painvin¹ · Christophe Camus¹ · Yves Le Tulzo¹ · Pierre Tattevin¹ · Matthieu Revest¹ · Audrey Le Bot¹ · Alice Ballerie⁴ · Berengère Cador-Rousseau⁴ · Mathieu Lederlin⁵ · Thomas Lebouvier⁶ · Yoann Launey⁶ · Maelle Latour^{2,3} · Clotilde Verdy^{2,3} · Delphine Rossille^{2,3} · Simon Le Gallou^{2,3} · Joelle Dulong^{2,3} · Caroline Moreau⁷ · Claude Bendavid⁷ · Mikael Roussel^{2,3} · Michel Cogne^{2,3} · Karin Tarte^{2,3} · Jean-Marc Tadié^{1,2,3,8} 

Received: 1 August 2020 / Accepted: 12 November 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Purpose The SARS-CoV-2 infection can lead to a severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) with prolonged mechanical ventilation and high mortality rate. Interestingly, COVID-19-associated ARDS share biological and clinical features with sepsis-associated immunosuppression since lymphopenia and acquired infections associated with late mortality are frequently encountered. Mechanisms responsible for COVID-19-associated lymphopenia need to be explored since they could be responsible for delayed virus clearance and increased mortality rate among intensive care unit (ICU) patients.

Methods A series of 26 clinically annotated COVID-19 patients were analyzed by thorough phenotypic and functional investigations at days 0, 4, and 7 after ICU admission.

Results We revealed that, in the absence of any difference in demographic parameters nor medical history between the two groups, ARDS patients presented with an increased number of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and a decreased number of CD8^{pos} effector memory cell compared to patients hospitalized for COVID-19 moderate pneumonia. Interestingly, COVID-19-related MDSC expansion was directly correlated to lymphopenia and enhanced arginase activity. Lastly, T cell proliferative capacity in vitro was significantly reduced among COVID-19 patients and could be restored through arginine supplementation.

Conclusions The present study reports a critical role for MDSC in COVID-19-associated ARDS. Our findings open the possibility of arginine supplementation as an adjuvant therapy for these ICU patients, aiming to reduce immunosuppression and help virus clearance, thereby decreasing the duration of mechanical ventilation, nosocomial infection acquisition, and mortality.

Keywords Covid-19 · ARDS · MDSC · Lymphocytes · Arginine · Cross infection · Immunosuppression

Florian Reizine and Mathieu Lesouhaitier contributed equally to this work.

✉ Jean-Marc Tadié
jeanmarc.tadie@chu-rennes.fr

¹ Infectious Diseases and Intensive Care Unit, Pontchaillou University Hospital, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

² SITI, Pole de Biologie, Pontchaillou University Hospital, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

³ UMR 1236, University of Rennes, INSERM, Etablissement Français du Sang Bretagne, Rennes, France

⁴ Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Pontchaillou University Hospital, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

⁵ Department of Radiology, Pontchaillou University Hospital, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

⁶ Department of Anesthesia and Critical Care, Pontchaillou University Hospital, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

⁷ Department of Biochemistry, Pontchaillou University Hospital, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

⁸ Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Hôpital Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex 9, France

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) which can lead to severe pneumonia with acute respiratory distress syndrome (ARDS), responsible for hospitalizations in intensive care unit (ICU) with an ICU mortality rate reaching 30 to 60% [1, 2]. Among the factors associated with this severe outcome, older age, comorbid conditions, and an elevated body mass index have been constantly reported [1–4]. Furthermore, lymphopenia and diminished viral clearance illustrated by persistent SARS-CoV-2 in the lung have been associated with COVID-19 severity and poor prognosis [5–7]. Viral clearance and the resolution of infection involve a complex immune response initiated by resident cells of the respiratory tract along with innate immune cells and is ultimately resolved by adaptive immune cells. Like SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 uses ACE2 as a receptor for bronchial epithelium cellular entry and activates inflammation through multiple pathways, directly related to cytotoxicity and dependent on innate immune cells [8, 9]. Although local immune responses have not yet been explored in COVID-19, it is known in severe respiratory viral infections that T cells crucially contribute to virus clearance from infected lungs and thus to a favorable outcome [5, 10]. In addition to delaying virus clearance, lymphopenia and/or functional T cell defects also favor secondary infections by opportunistic pathogens inducing prolonged mechanical ventilation responsible for late mortality [1, 11]. While sepsis is more often associated with bacterial or fungal infections [12], COVID-19 can thus feature “viral sepsis” with a pathologic host response characterized by an important cytokine release, and critically ill associated immunosuppression rather than “typical” ARDS [13, 14]. Lymphopenia, a crucial component of severe COVID-19, has in fact been noted in other severe respiratory viral infections, notably H1N1 influenza [15]. More broadly, immunosuppression in critically ill patients has been shown to be associated with increased lymphocyte apoptosis, decreased lymphocyte proliferation, and the striking emergence of myeloid-derived suppressor cells (MDSC), all associated with poorer outcome and nosocomial infections in ICU [16–18]. The underlying mechanisms of this MDSC-associated immunosuppression in infectious diseases are still not fully understood. However, various aspects of MDSC-mediated T cell immunosuppression have been reported in other conditions where MDSC are amplified, such as cancers and obesity [19]. Moreover, during acute viral illness, MDSC have been associated with chronicity in viral infections and poor clinical outcome [20]. Whether and how MDSC, including monocytic (M-MDSC) and granulocytic (G-MDSC) subsets, might be involved in the pathogenesis of SARS-Cov-2 has not yet been fully explored although emerging data reported that MDSC might influence disease severity [21, 22].

The present study explores the potential relationship between MDSC expansion, lymphopenia, and lymphocyte dysfunction in the first week following admission to ICU among COVID-19-associated ARDS patients.

Materials and Methods

Study Design, Patients, and Samples

This study was performed in the department of infectious diseases and the intensive care unit (ICU) at Rennes University Hospital. The study design was approved by our ethic committee (CHU Rennes, n°18.101-2), and informed consent was obtained from the patients. From late March 2020 to May 2020, 26 consecutive patients with moderate and severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) or moderate pneumonia related to SARS-CoV2 infection were prospectively enrolled and compared with 13 healthy donors. Pregnant women, patients younger than 18 years old, patients with malignancy, HIV-infected patients, and patients with preexisting immune disorders or receiving immunosuppressive agents were excluded. The presence of SARS-CoV-2 in respiratory specimens (nasal and pharyngeal swabs or sputum) was detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. COVID-19 moderate pneumonia was defined as cases exhibiting fever and respiratory symptoms with radiological findings of pneumonia. Severe and moderate ARDS were defined in accordance with international guidelines [23]. The following data were recorded: age, reason for admission, patient’s preexisting condition (current smoking, diabetes, hypertension, cardiovascular disease, pulmonary disease, liver disease), obesity (defined as a body mass index $> 30 \text{ kg/m}^2$), ICU and hospital length of stay, mortality, the need for invasive mechanical ventilation, the need for prone position ventilation, the need for renal replacement therapy, and the need for vasoconstrictor agent during ICU stay. The occurrence of nosocomial infections was also recorded [17, 24]. Initial clinical laboratory measurement included a complete blood count and a serum biochemical test. Lymphopenia was defined as an absolute lymphocyte count under $1.5 \text{ cells}/\mu\text{L} \times 10^3$. The Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score at admission to ICU were used to assess severity [25, 26]. A senior radiologist who was blinded to the other clinical information reviewed the CT chest scans and classified lung injury as absent or minimal ($< 10\%$), moderate (10–15%), extensive (25–50%), or severe (50–75%). Blood samples were collected within the first 24 h following admission, 4 days (day 4) after admission and 7 days (day 7) after admission when patients were still hospitalized. The time lapse between sampling and initiation of laboratory procedures was less than 1 h. Peripheral blood mononuclear

cells (PBMC) were isolated by Ficoll density gradient, and plasma samples were stored at -80°C until use.

Flow Cytometry

Quantification of monocytic populations was performed on fresh whole blood. After staining, erythrocytes were lysed twice with EasyLyse (Dako, Glostrup, Denmark) before washing in PBS. Monocyte populations have been determined based on CD14 and CD16 expression. M-MDSC were defined as $\text{CD14}^{\text{pos}}\text{HLA-DR}^{\text{low}}$ cells. Expression of PD-L1 has been determined on three monocyte populations ($\text{CD14}^{\text{pos}}\text{CD16}^{\text{neg}}$, $\text{CD14}^{\text{pos}}\text{CD16}^{\text{pos}}$, and $\text{CD14}^{\text{low}}\text{CD16}^{\text{pos}}$). G-MDSC and early-MDSC (e-MDSC) were defined on fresh PBMC isolated after Ficoll density gradient and were defined as $\text{CD45}^{\text{pos}}\text{Lin}^{\text{neg}}\text{HLA-DR}^{\text{low}}\text{CD15}^{\text{pos}}\text{CD11b}^{\text{pos}}$ for G-MDSCs and as $\text{CD45}^{\text{pos}}\text{CD3}^{\text{neg}}\text{Lin}^{\text{neg}}\text{HLA-DR}^{\text{low}}\text{CD15}^{\text{pos}}\text{CD33}^{\text{pos}}$ for e-MDSC. Gating schemes for the monocyte populations and representative staining panels of the MDSC populations are represented in the supplementary Figs. 1 and 2. Precision Count Beads (Biolegend, San Diego, CA) were added after staining to calculate the absolute number of cell subpopulations. B cells, NK cells, and T cells were analyzed on whole blood by using CD19, CD3, CD56, and CD16. Frequencies of cells were defined by flow cytometry, and absolute counts were calculated relative to the lymphocyte count defined on a cell counter before processing. Naïve (N), central memory (CM), effector memory (EM), and effector memory expressing CD45RA (EMRA) were defined based on CCR7 and CD45RA expression, on CD4 and CD8 cells. On each cell types, the expression of HLA-DR and PD-1 was analyzed. All antibodies and fluorochromes are summarized in supplementary Table 1. A Fortessa X20 flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) was used to run all samples. Data were analyzed using Kaluza 2.0 software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Apoptotic Analysis

Whole blood was incubated with CD3 BV421 (Becton Dickinson). Erythrocytes were then lysed twice using Easylyse (Dako, Glostrup, Denmark). To evaluate the proportion of apoptotic T cells, PE-conjugated active caspase-3 apoptosis kit (Becton Dickinson) has been used. Samples were run in a Fortessa X20 flow cytometer (Becton Dickinson) and data were analyzed using Kaluza 2.0 software (Beckman Coulter).

T Cell Proliferation

PBMC isolated after Ficoll density gradient were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, 200 nM; interchim, Montluçon, France). The quantification of T cells was obtained by staining PBMC with an anti-CD3 APC

antibody (Becton Dickinson). PBMC were seeded in 96-well round-bottom plates at a concentration of 1×10^5 T cells per well. Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% human AB serum (Biowest, Nuaille, France) and anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies ($0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$, Sanquin, Amsterdam, Netherlands). When indicated, cells were cultured in presence of the following chemical inhibitors or their controls: (i) L-arginine (1 mM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or with control D-arginine; (ii) coptisine (an IDO inhibitor) (50 nM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or vehicle; and (iii) PD-L1 blocking antibodies ($10 \mu\text{M}$, ebioscience, San Diego, CA, USA) or IgG. After 4 days of culture, cells were harvested and labeled with FVS 780 (Becton Dickinson) for cell viability, CD2 PC7 and CD8 APC (Beckman Coulter), CD4 BUV496 and CD14 BV605 (Becton Dickinson). CFSE dilution was assessed on FVS^{neg} viable T cells by flow cytometry on Fortessa X20 (Becton Dickinson) and results were analyzed with ModFit LT software (Verity Software, Topsham, ME).

Cytokine and Amino Acid Quantifications

Plasma interleukin (IL)-6, IL-10, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9), CXCL10, and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) were measured using a Milliplex map magnetic bead kit (EMD Millipore). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity was evaluated by measuring kynurenine and tryptophan levels and arginase activities by measuring ornithine and arginine concentrations by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC MS-MS).

Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as median (interquartile range, IQR) and compared using the nonparametric Mann-Whitney *U* test or the Kruskal-Wallis test or the Wilcoxon matched-pairs for matched samples as appropriate. Dunn's correction tests were used if multiple comparisons were requested. Qualitative data were compared using chi-square test or Fisher exact test when required. Correlations between two continuous variables were investigated using the Pearson's rank test. Tests were two-sided with significance set at α less than 0.05. All data were analyzed with GraphPad Prism 8.4 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results

Study Population

Twenty-six COVID-19 patients were included in this prospective study (13 with ARDS and 13 with moderate pneumonia).

Representative CT scans are shown in Fig. 1 and their demographic and baseline characteristics in Table 1. Importantly, there was no difference in demographic characteristics, including comorbidities classically associated with COVID-19 severity, nor was there any difference in duration of symptoms before inclusion between the two groups of patients, thus making it possible to focus our analysis on the biological parameters related to COVID severity. Complete clinical characteristics at day 0, day 4 and day 7 are summarized in the supplementary Table 2.

Of note, patients admitted in ICU received selected digestive decontamination as already described [27]. In addition, the patients received 3rd-generation cephalosporin for 1 week. None received corticosteroids or experimental treatments.

Lymphopenia, Accumulation of Circulating MDSC, and Susceptibility to Nosocomial Infections

To determine the systemic impact of SARS-COV-2 on immune cells, a complete blood count was performed first. An increase in leukocyte counts at day 4 and day 7 along with an

increased number of circulating neutrophils was noted among COVID-19 ARDS patients compared to patients with moderate pneumonia (Fig. 2A). By contrast, lymphopenia was observed at admission for both groups of COVID-19 patients and persisted until day 7 only for patients with ARDS (Fig. 2A). This persistent lymphopenia was specifically related to a T cell count decrease whereas NK and B cell counts were not significantly affected (Fig. 2A). Conversely, circulating monocytes were early and transiently reduced specifically among ARDS patients. Platelets counts were not affected by clinical status. By flow cytometry, we defined CD4 and CD8 effector memory T cells to be decreased at day 4 and/or day 7 while other CD4 and CD8 subsets were unaffected (Fig. 2B and Supplementary Fig. 3). As in previous reports [6], all of our patients exhibited lymphopenia at the time of admission, predominantly due to a CD8 effector memory T cell defect (CD8 EM). This anomaly persisted during the first week after admission among ARDS patients.

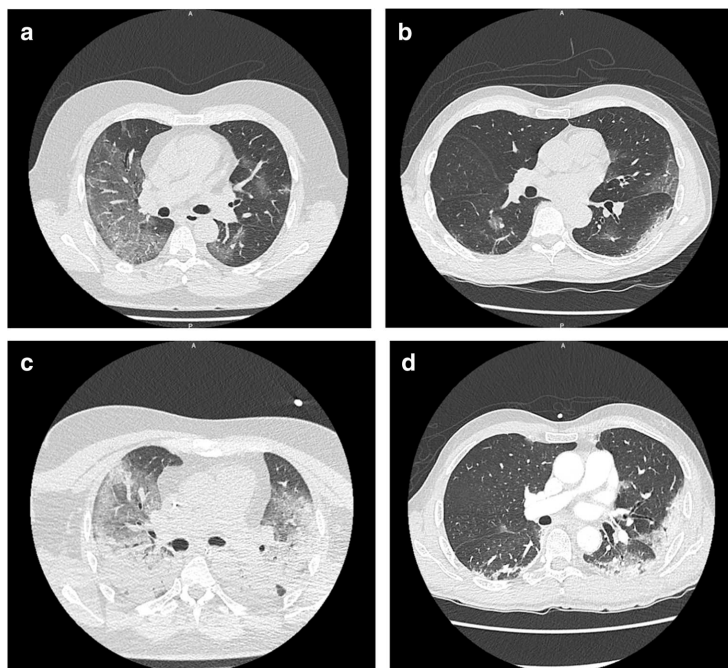
In parallel, M-MDSC and G-MDSC were both enriched among moderate and severe COVID patients at day 0 and remained high until day 7 only in ARDS patients thus

Table 1 Demographic and baseline characteristics

	All patients (n = 26)	ARDS COVID (n = 13)	Moderate COVID (n = 13)	P value
Demographic characteristics				
Age, years	55 (47–67)	58 (53–67)	54 (45–67)	0.19
Sex	18 (69)	10 (77)	8 (61)	0.67
Men	8 (31)	3 (23)	5 (39)	
Women				
Current smoking	0	0	0	> 0.99
Coexisting conditions				
Any	15 (58)	7 (54)	8 (61)	> 0.99
Diabetes	4 (15)	3 (23)	1 (8)	0.59
Hypertension	9 (35)	5 (38)	4 (31)	0.22
Cardiovascular disease	3 (11)	3 (23)	0	> 0.99
Obesity (BMI > 30)	9 (35)	4 (31)	5 (38)	> 0.99
Clinical and biological baseline characteristics				
Days from illness onset to dyspnea	10 (8–12)	10 (7–13)	10 (8–11)	0.989
Ratio of PaO ₂ to F _i O ₂	214 (139–362)	140 (110–202)	357 (250–444)	< 0.0001
SAPS II score on day 1	26 (17–35)	33 (19–39)	22 (13–28)	0.11
SOFA score on day 1	2 (1–9.5)	9 (2–10)	1 (0–1)	< 0.0001
Outcomes				
Secondary infections	7 (27)	7 (54)	0	0.007
Vasoconstrictive agents	7 (27)	7 (54)	0	0.007
CT analysis scoring				
Moderate (10–15%)	4 (15)	0	4 (31)	0.003
Extent (25–50%)	15 (58)	6 (46)	9 (69)	
Severe (50–75%)	7 (27)	7 (54)	0	

Data are presented as median (IQR), n (%). P values comparing ARDS and moderate pneumonia cases are tested by Mann-Whitney U test (continuous variables) or chi-square test (categorical variables). COVID-19 coronavirus disease; BMI body mass index; IQR interquartile range; PaO₂ arterial oxygen tension; SAPS II Simplified Acute Physiology Score II; SOFA Sequential Organ Failure Assessment; CT computed tomography

Fig. 1 CT scan from a patient hospitalized for SARS-CoV-2 induced ARDS at admission (A) and 7 days after (C). CT scan from a patient hospitalized for SARS-CoV-2-induced moderate pneumonia at admission (B) and 9 days after (D)



mirroring T cell lymphopenia (Fig. 2C). Interestingly, M-MDSC and G-MDSC were inversely correlated with T cell count suggesting that they could contribute to T cell dysfunction. Of note, circulating early-stage MDSC (e-MDSC) were not affected by the ARDS status (data not shown). Among the ARDS patients, seven were diagnosed with ventilator-associated pneumonia (VAP) related to infection with *Aspergillus fumigatus* ($n = 5$), herpes simplex virus ($n = 4$), and *Enterococcus faecalis* ($n = 1$). Noteworthy, VAP occurred after several days in ICU since median duration of mechanical ventilation at infection was 6 days (2–10). This subgroup of ARDS patients with secondary infections had a more marked lymphopenia already detectable on the day of admission and a higher M-MDSC count at day 7 (Fig. 2D). Conversely, G-MDSC were not associated with secondary infection. Altogether, these data indicate that COVID-19 was significantly associated with lymphopenia at admission, mostly affecting CD8 EM cells and to a lesser extent CD4 EM cells and that T cell defect was correlated with M-MDSC expansion and persists in patients with ARDS until day 7.

Cytokines Analysis

Since cytokine release syndrome (CRS) is a major challenge in COVID-19 [5], various plasma cytokine levels were

evaluated in all our COVID-19 patients compared to Healthy Donors (HD) (Fig. 3). Several factors were increased in all COVID-19 patients, but to significantly higher levels in the ARDS group: this included proinflammatory IL-6 and anti-inflammatory IL-10, together with chemokines CCL2, CXCL10, and CXCL9. Finally, only ARDS patients showed increased G-CSF.

COVID-19 Is Associated with a Significant Decrease of Arginine Concentration; Its Supplementation Restores In Vitro T Cells' Ability to Proliferate

The MDSC increase prompted us to evaluate the activity of enzymes known to support their immunosuppressive activity. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is known to be expressed in M-MDSC [19]. Accordingly, enhanced IDO activity was found among COVID-19 patients, and it was predominant among patients with ARDS and correlated with lymphopenia (Fig. 4A). Additionally, we measured arginase activity, which is expressed by e-MDSC, G-MDSC, and M-MDSC [28]. Our results showed a prolonged decrease in plasma arginine levels along with enhanced arginase activity among COVID patients, particularly in the most severe forms. As for IDO, a correlation between arginase activity and lymphopenia was observed (Fig. 4A). Both IDO and arginase activity could negatively have

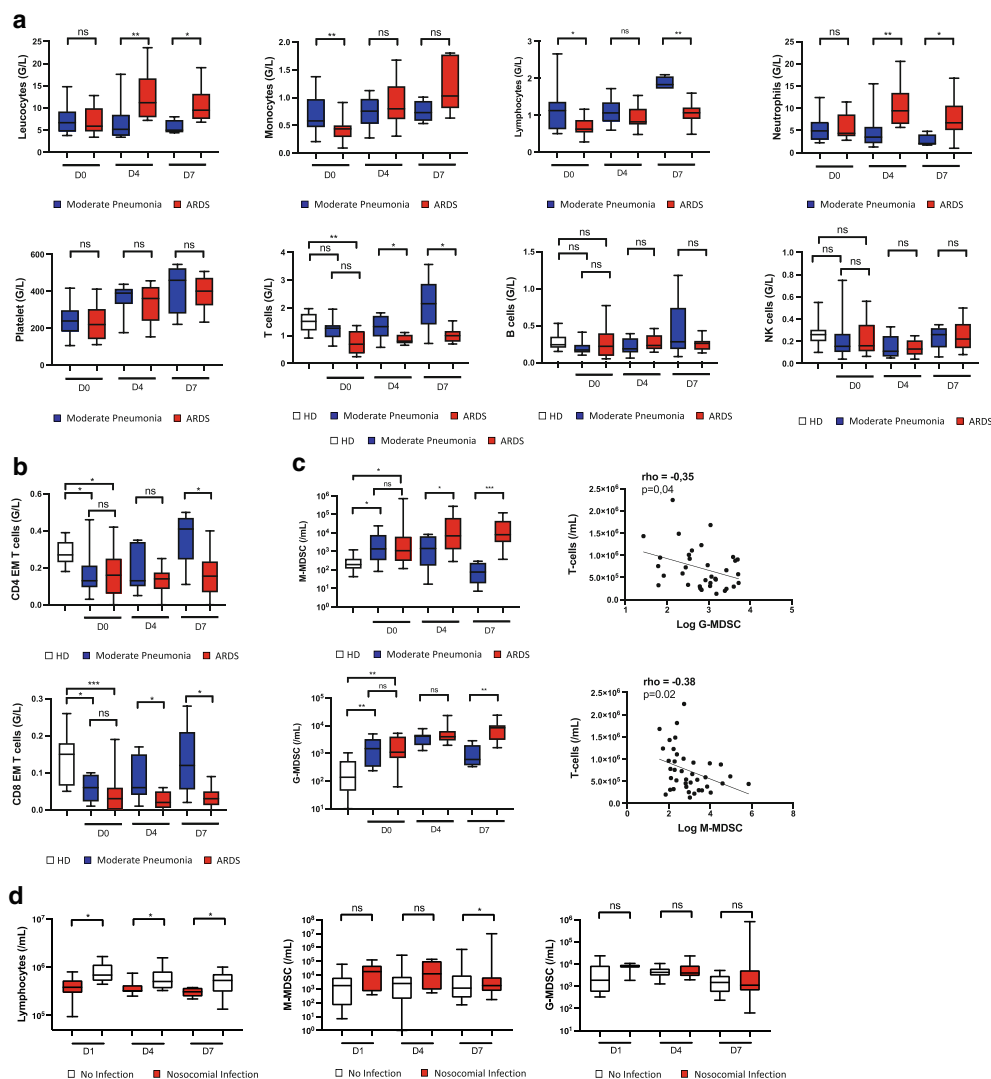


Fig. 2 SARS-CoV-2-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) is associated with lymphopenia and an accumulation of circulating myeloid-derived suppressor cells (MDSC) leading to a higher susceptibility to nosocomial infections. **A** Blood count from 13 patients hospitalized for SARS-CoV-2 moderate pneumoniae (MP) and 13 patients hospitalized for SARS-CoV-2 ARDS (ARDS) 24 h after their admission (D0), 4 days after (D4), and 7 days after (D7) and lymphocytes subsets defined by flow cytometry from 13 healthy donors (HD), 13 patients hospitalized for SARS-CoV-2 MP, and 13 patients hospitalized for SARS-CoV-2 ARDS. **B** CD4 and CD8 effector memory (EM) T cell numeration by flow cytometry. **C** Peripheral monocytic-MDSC (M-MDSC) and granulocytic-MDSC (G-MDSC) recruitment among ARDS patients, moderate COVID cases, and HD. **D** Two groups were defined

according to the presence or absence of a nosocomial infection. Lymphocyte count, M-MDSC, and G-MDSC recruitment according to the acquisition of nosocomial infection. Nosocomial infections as defined by the Centers for Disease Control and Prevention were screened among patients hospitalized for a SARS-CoV-2 infection over 28 days after their admission. Box and whiskers plot features are as follows: central line in the box is the median, bottom line of the box is first quartile (25%), and top line of box is third quartile (75%). Bottom of whiskers is minimum value; top of whiskers is maximum value. Groups were compared using Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison test (**A**, **B**, and **C**) or Mann-Whitney *U* test (**A** and **D**) as appropriate. Pearson correlation coefficients (ρ) and *P* values are indicated for each correlation (**C**). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001

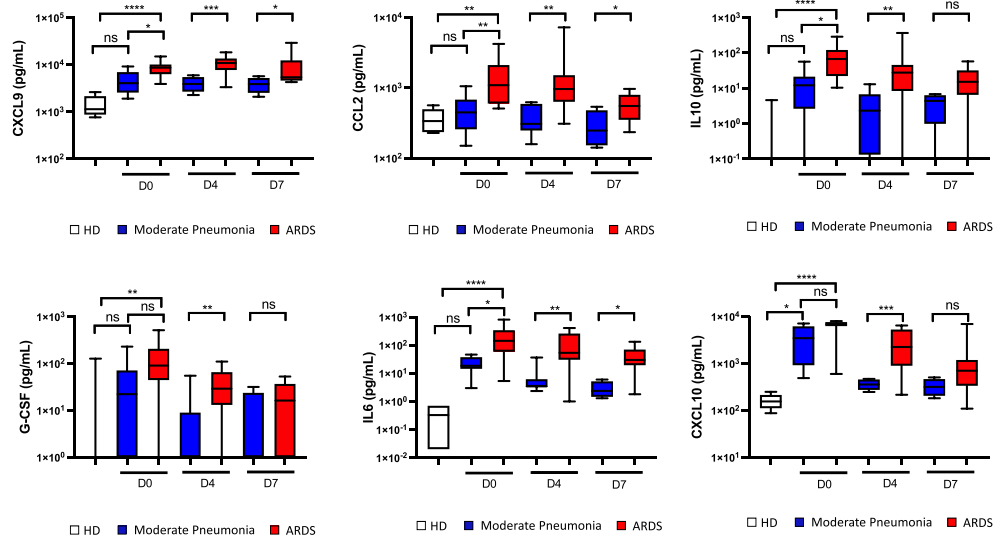


Fig. 3 SARS-CoV2 ARDS induces a significant increase among inflammatory, chemoattractant, and immunosuppressive cytokines. MDSC recruiting (IL-6, CCL2, G-CSF), chemoattractant (CXCL9, CXCL10, CCL2), inflammatory (IL-6), and immunosuppressive (IL-10) cytokine assessments were performed among the ARDS patients (ARDS), the moderate COVID cases (MP), and the healthy donors

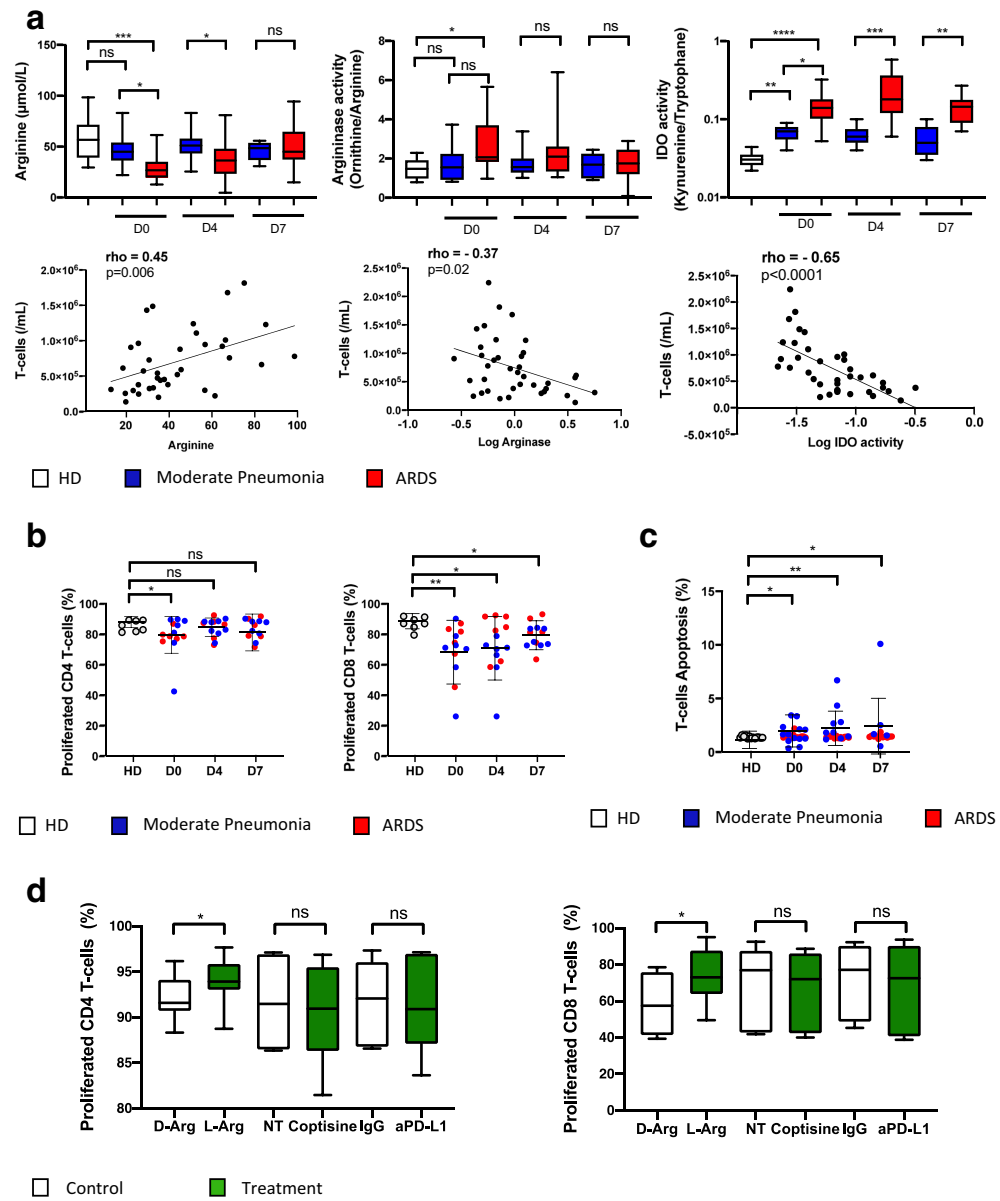
(HD). Box and whiskers plot features are as follows: central line in the box is the median, bottom line of the box is first quartile (25%), and top line of box is third quartile (75%). Bottom of whiskers is minimum value; top of whiskers is maximum value. Groups were compared using Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

a negative impact on T cell functions, and T cell proliferation is in particular dependent on arginine supply [28, 29]. Functional assessment of COVID-19 patient T cells accordingly showed a decreased ability to proliferate in vitro, which predominated for CD8 T cells, although no difference was found between both groups of COVID-19 patients (Fig. 4B). Noteworthy, ability to proliferate in vitro was significantly decreased at admission in ARDS patients for CD4 and CD8 T cells (CD4 T cell: HD vs COVID ARDS D0: 88.12 vs 80.9; $p = 0.01$; CD8 T cell: HD vs COVID ARDS D0: 86.45 vs 77.57; $p = 0.03$) meanwhile a significant decrease was observed only for CD8 T cells in patients with moderate pneumonia (CD4 T cell: HD vs COVID MP D0: 88.12 vs 86.68; $p = 0.26$; CD8 T cell: HD vs COVID MP D0: 86.45 vs 70.94; $p = 0.01$). An increased proportion of apoptotic T cells among COVID-19 patients compared to healthy donors (HD) was also observed (Fig. 4C). Interestingly, PD-1 and PD-L1 exhaustion markers were also more strongly expressed in T cells and monocytes, respectively, without any relationship with COVID severity (Supplementary Fig. 4). In order to validate the potential role of arginine deprivation in the T cell proliferation defect, PBMC from ARDS patients were further cultured under L-Arginine supplementation. This supplementation partially but significantly restored the ability for T cell to proliferate. In contrast, neither the addition of IDO inhibitor nor the addition of anti PD-L1 produced any restoration of T cell proliferation (Fig. 4D).

Discussion

Severe forms of COVID-19 with ARDS have been associated with biological and clinical markers of acquired immunosuppression such as opportunistic bacterial infection, virus reactivation, and invasive aspergillosis [1, 11, 30]. This immunosuppression constantly involves lymphopenia and an unbalanced innate vs adaptive immune response, thus delaying pathogen clearance and promoting lung injury. However, the basis for such a dysregulation remain poorly understood [5, 21, 31]. We found that COVID-19 was significantly associated with lymphopenia at admission, mostly affecting CD8 EM cells, and that T cell defects were correlated with M-MDSC expansion and decreased arginine level.

Reduced T cell number persisted during the first week after admission among ARDS patients, confirming that lymphopenia is a marker of severity in COVID-19 [6, 32]. CD8 T cells are essential for controlling the spread of the virus and for limiting pulmonary damage and mortality, by eliminating infected epithelial cells, thus decreasing virus replication [29, 33]. Autopsies of some patients with COVID-19 pneumonia have evidenced interstitial inflammatory infiltrates dominated by lymphocytes, suggesting that lymphopenia may result from the migration of T cells to injured tissues [34]. Whereas infected T cells by SARS-CoV-2 has been



documented, it is nevertheless unclear whether a direct cytotoxic effect might contribute to lymphopenia, unlike MERS-CoV infection, in which the virus directly binds its receptor to

T cells [8, 9]. Our findings suggest that the diminished ability of lymphocytes to proliferate and the enhanced apoptosis are among contributing factors of change in lymphocyte count at

Fig. 4 SARS-CoV-2 ARDS induces a significant decrease in plasma arginine concentration; its supplementation restores the ability of T-cells to proliferate in-vitro. **A** Plasma arginine, ornithine, kynurenine, and tryptophan concentrations were measured by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry among 13 healthy donors (HD), 13 patients hospitalized for SARS-CoV-2 moderate pneumonia (MP), and 13 patients hospitalized for SARS-CoV-2 ARDS (ARDS) 24 h after their admission (D0), 4 days after (D4), and 7 days after (D7). Arginase activity was calculated using the ornithine/arginine ratio and IDO activity was calculated using the kynurenine/tryptophan ratio. **B** PBMC obtained at admission (D0), 4 days after admission (D4), and 7 days after (D7) from 14 patients hospitalized for a SARS-CoV-2 infection and from 7 HD were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 monoclonal antibodies after CFSE labelling. The proportion of proliferated T-cells were determined by flow cytometry. **C** Proportion of apoptotic T cells was determined by flow cytometry using a Caspase-3 staining among 26 patients hospitalized for a SARS-CoV-2 infection at admission (D0), 4 days after (D4), and 7 days after (D7) and from 11 HD. Results are expressed by the percentage of Caspase3^{pos} T cells. **D** PBMC obtained from 7 patients hospitalized for a SARS-CoV-2 ARDS were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 monoclonal antibodies after CFSE labelling. Culture media were enriched with either L-arginine (L-Arg) or with control D-arginine (D-arg), IDO inhibitor (Coptisine) or vehicle (NT), PD-L1 binding antibody (aPD-L1), or its isotype (IgG). The proportion proliferated T cells were determined by flow cytometry. Box and whiskers plot features are as follows: central line in the box is the median, bottom line of the box is first quartile (25%), and top line of box is third quartile (75%). Bottom of whiskers is minimum value; top of whiskers is maximum value. Groups were compared using Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison test (**A**), Mann-Whitney *U* test (**A**, **B**, and **C**) or Wilcoxon test (**D**) as appropriate. Pearson correlation coefficients (ρ) and *P* values are indicated for each correlation (a). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001

admission. The loss of normal T cell function could be related to the MDSC expansion observed in the most severe forms of COVID-19 with ARDS. Human MDSC belong to two major types: *granulocytic* (G-MDSC, Lin^{neg}HLA-DR^{neg}CD33^{pos}CD11b^{pos}) and *monocytic* (M-MDSC, CD14^{pos}HLA-DR^{low}) [17]. Because monocyte and neutrophil counts were increased among ARDS patients and were associated with a decrease in effector memory T cells, we wondered whether an accumulation of circulating MDSC was present among COVID-19 patients. The sustained expansion of plasma MDSC in the first week of hospitalization observed among COVID-19 patients was more pronounced in patients with COVID-19-associated ARDS compared to patients with moderate COVID-19 pneumonia. These cells considerably impair the adaptive immune system by suppressing CD4 and CD8 T cell activation and function, and they have been associated with infection and mortality among septic patients [18, 19]. As found in the present study, up to 50% of COVID-19-associated ARDS had a diagnosis of nosocomial infections (ventilator associated pneumonia) during their ICU stay with opportunistic pathogens or viral reactivations. These infections highlight the profound and sustained acquired immunosuppression among COVID-19-associated ARDS patients

which has previously been described among patients admitted for septic shock [12, 18].

In line with the increase in circulating MDSC, cytokines involved in their recruitment and expansion (IL-6, CCL2, and G-CSF) were found at higher concentrations in the plasma in the most severe forms of COVID-19 [35]. Interestingly, an increase in cytokines involved in the chemo-attraction of activated T cells (CXCL9, CXCL10), myeloid cells (CXCL9, CXCL10, CCL2), and monocyte polarization (CXCL9) was detected among ARDS patients compared to patients with moderate pneumonia, even at ICU admission, suggesting a migration of myeloid and T cells from peripheral blood to tissue [34]. Additionally, both inflammatory (IL-6) and immunosuppressive (IL-10) cytokines were markedly present among ARDS patients, the latter one being one of the major mechanisms of immune suppression of MDSC [19]. It is worth noting that both subsets of MDSC are released from the bone marrow following various inflammatory or infectious stimuli, such as IL-6 or G-CSF, which were found at higher concentrations in the plasma in the most severe forms of COVID-19 [5, 11, 36]. However, the suppressive activity of MDSC requires not only factors that promote their expansion but also factors that induce MDSC activation such as IL-10 [19]. Several studies support the hypothesis that M-MDSC could be involved in viral infection chronicity and also in acute infections decreasing virus clearance and causing lung injury [36]. Our finding highlights the important role of cytokines in COVID-19 and may support cytokine-targeted therapy to correct the profound defect in host immunity [37, 38].

Early M-MDSC expansion in COVID-19-associated ARDS was associated with a decreased number of T cells that could be explained by a decreased ability of lymphocytes to proliferate since T cell apoptosis was barely enhanced. This decreased ability of lymphocytes to proliferate has already been found among critically ill septic patients and correlated to a decreased availability of arginine [17]. Additionally, IDO activity was increased at admission among COVID-19 patients and associated with disease severity. IDO is an intracellular, non-secreted enzyme, which catabolizes the degradation of tryptophan into kynurenine. Tryptophan catabolites have immunomodulating effects, leading to the inhibition of T cell activation, T cell death, and suppression of T cell effector functions [39]. Besides interferon- γ , which is the most important inducer of IDO, IL-6 can also stimulate IDO expression by immune cells and MDSC [19, 39]. Although the relationship between COVID-19 and IDO activity has not been studied yet, enhanced IDO activity appears to be associated with lymphopenia as illustrated by the correlation found in our study and should be suspected as a worsening parameter in COVID-19 pneumonia.

Therapeutic interventions principally focus on targeting the virus directly or diminishing the viral load in order to decrease disease severity and ICU admissions [31, 32]. However,

adjuvant therapeutic interventions are needed to limit the dysfunctional immune response observed among COVID-19 patients and to decrease the late mortality observed in ICU due to persistent pulmonary inflammation and nosocomial infections acquisition [40]. Arginine administration has been found to maintain immune homeostasis, particularly with respect to T cells and macrophage functions and a reversal of the alteration in T cell function associated with trauma or surgery has been demonstrated among patients receiving arginine-enriched diet [41, 42]. Although there are no convincing results in patients with sepsis [43], restoring arginine availability could restore normal T cell function including their ability to proliferate, as we found in the present study.

Our study has several limitations. Firstly, only a few patients were included and we did not conduct sample size calculation. This methodological issue could weaken our conclusions. Secondly, we did not provide mechanistic information on how arginine could restore T cell function. Although the immunosuppressive effects of MDSC mediated through arginine depletion and lymphocyte mitochondrial dysfunction have been extensively studied in malignancies [28], mechanistic approaches should be performed in COVID-19 patients to strengthen our conclusions and develop therapeutic trials. Lastly, since T cell subpopulations differ in their proliferation rates and metabolic profile when activated, providing data regarding the capacity of purified COVID-19 T cell subsets to proliferate would be mandatory to definitively conclude on the qualitative versus quantitative T cell alterations [28, 44, 45].

Conclusion

To summarize, COVID-19 is responsible for MDSC expansion and T cell dysfunction, mainly CD8 T cells, through arginine depletion. This dysfunction is sustained in ARDS patients, the most severe form of COVID-19. Restoring arginine availability could be of value to restore lymphocyte function and prevent patients from acquiring nosocomial infections during their ICU stay.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00920-5>.

Author Contributions Conception and design was provided by FR, ML, MG, MR, MC, KT, and JMT. Experiments, data analysis, and interpretation were carried out by FR, ML, MG, KP, AG, MaL, CV, DR, SLG, JD, CM, CB, MR, MC, KT, and JMT. Patient inclusions were performed by AM, BP, CC, YLT, MRe, ALB, AB, BCR, TL, and YL. CT scan analyses were performed by MLeD. Drafting and revision of the manuscript were carried out by FR, ML, MG, MR, MC, KT, and JMT.

Funding This work was supported by the CFTR² (COVID Fast Track Research Rennes) grant from the University hospital of Rennes, France (FR, ML). MC was supported by a grant from Fondation pour la Recherche Médicale and Agence Nationale de la Recherche (ANR,

Flash CoVid « HARMONICOV » grant. JMT was supported by a Fondation de l'Avenir grant (Prix des donateurs, Mutualité Fonction Publique).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests

References

- Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, et al. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy region, Italy. *JAMA*. 2020;323:1574–81.
- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395:1054–62.
- Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020;180:934–43.
- Du RH, Liang LR, Yang CQ, Wang W, Cao TZ, Li M, et al. Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. *Eur Respir J*. 2020.
- Tay MZ, Poh CM, Renia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020;20:363–74.
- Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunologic features in severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. 2020;130:2620–9.
- Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020.
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181:281–92 e286.
- Fung TS, Liu DX. Human coronavirus: host-pathogen interaction. *Annu Rev Microbiol*. 2019;73:529–57.
- Zhao J, Zhao J, Legge K, Perlman S. Age-related increases in PGD(2) expression impair respiratory DC migration, resulting in diminished T cell responses upon respiratory virus infection in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:4921–30.
- Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med*. 2020.
- Leijte GP, Rimmel T, Kox M, Bruse N, Monard C, Gossez M, et al. Monocytic HLA-DR expression kinetics in septic shock patients with different pathogens, sites of infection and adverse outcomes. *Crit Care*. 2020;24:110.
- Gattinoni L, Coppola S, Cressoni M, Busana M, Rossi S, Chiumello D. Covid-19 does not Lead to a “typical” acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;201:1299–300.
- Le Balch P, Pincaux K, Pronier C, Seguin P, Tadie JM, Reizine F. Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients. *Crit Care*. 2020;24:530.
- Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quinones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med*. 2009;361:680–9.

16. Gey A, Tadie JM, Caumont-Prim A, Hauw-Berlemont C, Cynober L, Fagon JY, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill patients. *Clin Exp Immunol*. 2015;180:280–8.
17. Uhel F, Azzaoui I, Gregoire M, Pangault C, Dulong J, Tadie JM, 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.
18. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14:121–37.
19. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol*. 2018;19:108–19.
20. Dorhoi A, Glaria E, Garcia-Tellez T, Nieuwenhuizen NE, Zelinskyy G, Favier B, et al. MDSCs in infectious diseases: regulation, roles, and readjustment. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68:673–85.
21. Bordoni V, Sacchi A, Cimini E, Notari S, Grassi G, Tartaglia E, et al. An inflammatory profile correlates with decreased frequency of cytotoxic cells in COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020.
22. Agrati C, Sacchi A, Bordoni V, Cimini E, Notari S, Grassi G, et al. Expansion of myeloid-derived suppressor cells in patients with severe coronavirus disease (COVID-19). *Cell Death Differ*. 2020;27:3196–207.
23. Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. *JAMA*. 2012;307:2526–33.
24. Blot SI, Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, Meersseman W, Brusselaers N, et al. A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:56–64.
25. Le Gall JR, Limeshow S, Saulnier F. A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*. 1993;270:2957–63.
26. Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score: development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Crit Care*. 2019;23:374.
27. Camus C, Bellissant E, Sebille V, Perrotin D, Garo B, Legras A, et al. Prevention of acquired infections in intubated patients with the combination of two decontamination regimens. *Crit Care Med*. 2005;33:307–14.
28. Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, Basso C, Feng Y, Fuhrer T, et al. L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell*. 2016;167:829–42 e813.
29. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12:492–9.
30. van Arkel ALE, Rijpstra TA, Belderbos HNA, van Wijngaarden P, Verweij PE, Bentvelsen RG. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020.
31. Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet*. 2020;395:1517–20.
32. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2020.
33. Jozwik A, Habibi MS, Paras A, Zhu J, Guvenel A, Dhariwal J, et al. RSV-specific airway resident memory CD8+ T cells and differential disease severity after experimental human infection. *Nat Commun*. 2015;6:10224.
34. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020;8:420–2.
35. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:162–74.
36. Goh C, Narayanan S, Hahn YS. Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? *Immunol Rev*. 2013;255:210–21.
37. Remy KE, Mazer M, Striker DA, Ellebedy AH, Walton AH, Unsinger J, et al. Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections. *JCI Insight*. 2020;5.
38. Luo Y, Mao L, Yuan X, Xue Y, Lin Q, Tang G, et al. Prediction model based on the combination of cytokines and lymphocyte subsets for prognosis of SARS-CoV-2 infection. *J Clin Immunol*. 2020;40:960–9.
39. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol*. 2013;34:137–43.
40. Hall MW, Joshi I, Leal L, Ooi EE. Immune modulation in COVID-19: strategic considerations for personalized therapeutic intervention. *Clin Infect Dis*. 2020.
41. Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA*. 2001;286:944–53.
42. Tepaske R, Velthuis H, Oudemans-van Straaten HM, Heisterkamp SH, van Deventer SJ, Ince C, et al. Effect of preoperative oral immune-enhancing nutritional supplement on patients at high risk of infection after cardiac surgery: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001;358:696–701.
43. Rice TW. Immunonutrition in critical illness: limited benefit, potential harm. *JAMA*. 2014;312:490–1.
44. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med*. 2017;23:18–27.
45. Kedia-Mehta N, Finlay DK. Competition for nutrients and its role in controlling immune responses. *Nat Commun*. 2019;10:2123.

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

Table E1: Antibodies used for flow cytometry

Antibody	Clone	Fluorochrome	Manufacturer	Panel
CD3	UCHT1	APC	Becton Dickinson	G-MDSC, M-MDSC
CD15	W6D3	BV421	Becton Dickinson	G-MDSC
CD45	HI30	BV510	Becton Dickinson	G-MDSC, M-MDSC
CD11b	D12	BV605	Becton Dickinson	G-MDSC
CD14	M5E2	FITC	Becton Dickinson	G-MDSC, M-MDSC
CD19	HIB19	FITC	Becton Dickinson	G-MDSC
CD20	2H7	FITC	Becton Dickinson	G-MDSC
CD56	B159	FITC	Becton Dickinson	G-MDSC
CD123	7G3	FITC	Becton Dickinson	G-MDSC
CD279	EH12.1	PECF594	Becton Dickinson	G-MDSC, M-MDSC, T-cell subset
CD33	P67.6	PC7	Biolegend	G-MDSC
HLA-DR	G46-6	BUV395	Becton Dickinson	G-MDSC, M-MDSC
CD16	3G8	A700	Becton Dickinson	M-MDSC
CD66b	G10F5	BV421	Becton Dickinson	M-MDSC
CD335	9E2	BV421	Becton Dickinson	M-MDSC
CD274	MIH1	BV786	Becton Dickinson	M-MDSC
HLA-DR	Immu-357	APC	Beckman Coulter	T-cell subset
CD56	B159	V450	Becton Dickinson	T-cell subset
CD16	3G8	BV421	Becton Dickinson	T-cell subset
CD45-RA	HI100	BV605	Biolegend	T-cell subset
Tim-3	F38-2E2	BV785	Biolegend	T-cell subset
CD233	3DS223H	FITC	Ebioscience	T-cell subset
CCR7	3D12	PC7	Becton Dickinson	T-cell subset
CD3	UCHT1	BUV395	Becton Dickinson	T-cell subset
CD4	SK3	BUV496	Becton Dickinson	T-cell subset
CD8	SK1	BUV805	Becton Dickinson	T-cell subset

Table E2: Clinical characteristics at baseline, at D4 and Day 7

	All patients (n=26)	ARDS COVID (n=13)	Moderate COVID (n=13)	P value
Baseline clinical and biological characteristics				
Temperature (°C)	38.4 (37.6-39.0)	39.0 (38.4-39.4)	37.8 (37.2-38.1)	0.011
Heart rate (/min)	94 (84-103)	96 (88-105)	89 (75-102)	0.058
Systolic pressure	104 (90-133)	93 (85-105)	125 (101-142)	0.005
Days from illness onset to dyspnoea	10 (8-12)	10 (7-13)	10 (8-11)	0.989
Ratio of PaO ₂ to F.O ₂	214 (139-362)	140 (110-202)	357 (250-444)	<0.0001
SAPS II score on day 1	26 (17-35)	33 (19-39)	22 (13-28)	0.11
SOFA score on day 1	2 (1-9.5)	9 (2-10)	1 (0-1)	<0.0001
Clinical characteristics at day 4				
Temperature (°C)	37.8 (37.1-38.9)	38.8 (38.1-39.0)	37.0 (36.9-37.4)	<0.0001
Heart rate (/min)	94 (84-103)	96 (88-105)	89 (75-102)	0.22
Systolic pressure	112 (98-133)	102 (86-105)	127 (117-139)	0.01
SOFA score on day 4	6 (1-9)	9 (7-11)	0 (0-1)	<0.0001
Clinical characteristics at day 7				
Temperature (°C)	37.7 (37.1-38.2)	38.1 (37.7-38.4)	37.1 (37.0-37.4)	0.02
Heart rate (/min)	97 (88-102)	100 (93-112)	94 (87-97)	0.14
Systolic pressure	114 (103-128)	109 (96-119)	123 (112-143)	0.13
SOFA score on day 7	7 (1-8)	7 (7-8)	0 (0-0)	0.0002

Data are presented as median (IQR), n (%), p values comparing ARDS and moderate pneumonia cases are tested by Mann–Whitney U test (continuous variables) or Chi-square test (categorical variables) Abbreviations: PaO₂, arterial oxygen tension; SAPS II : Simplified Acute Physiology Score II; SOFA = Sequential Organ Failure Assessment

Figure E1

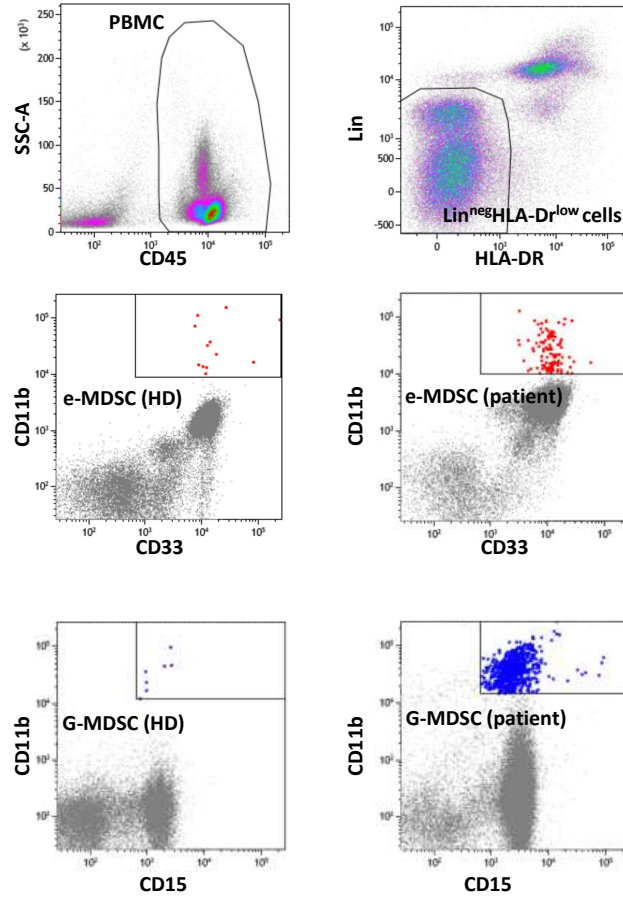


Figure E2

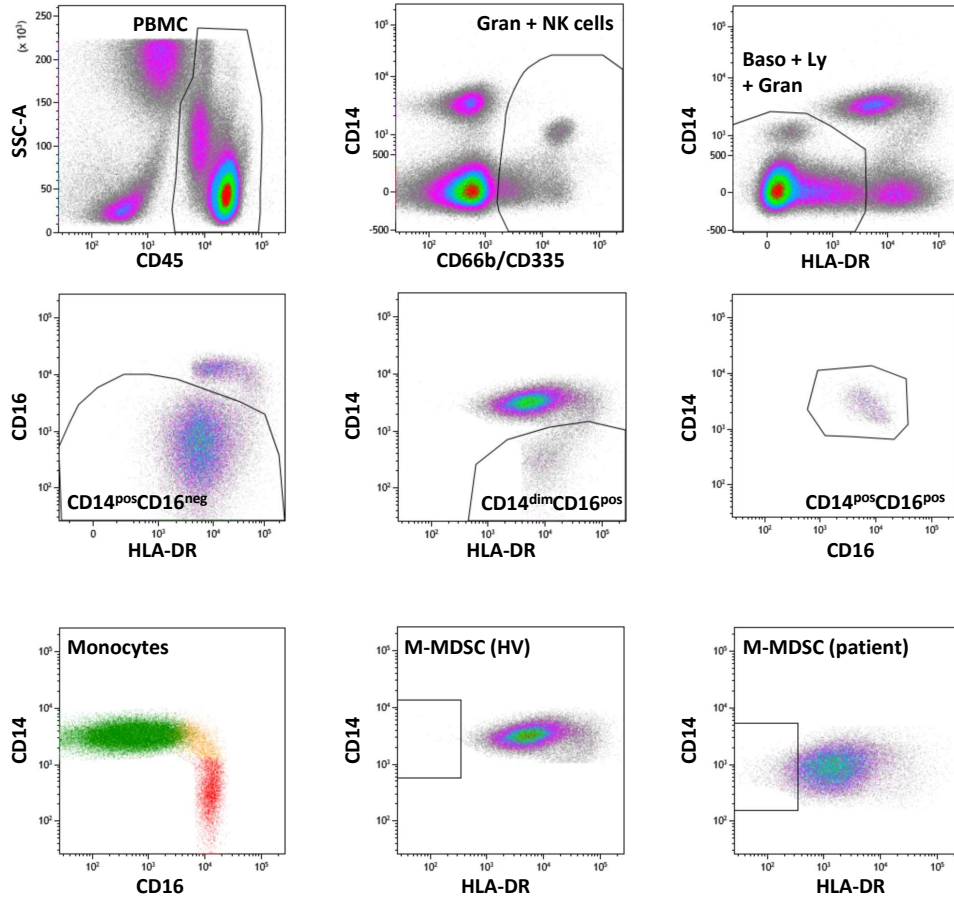


Figure E3

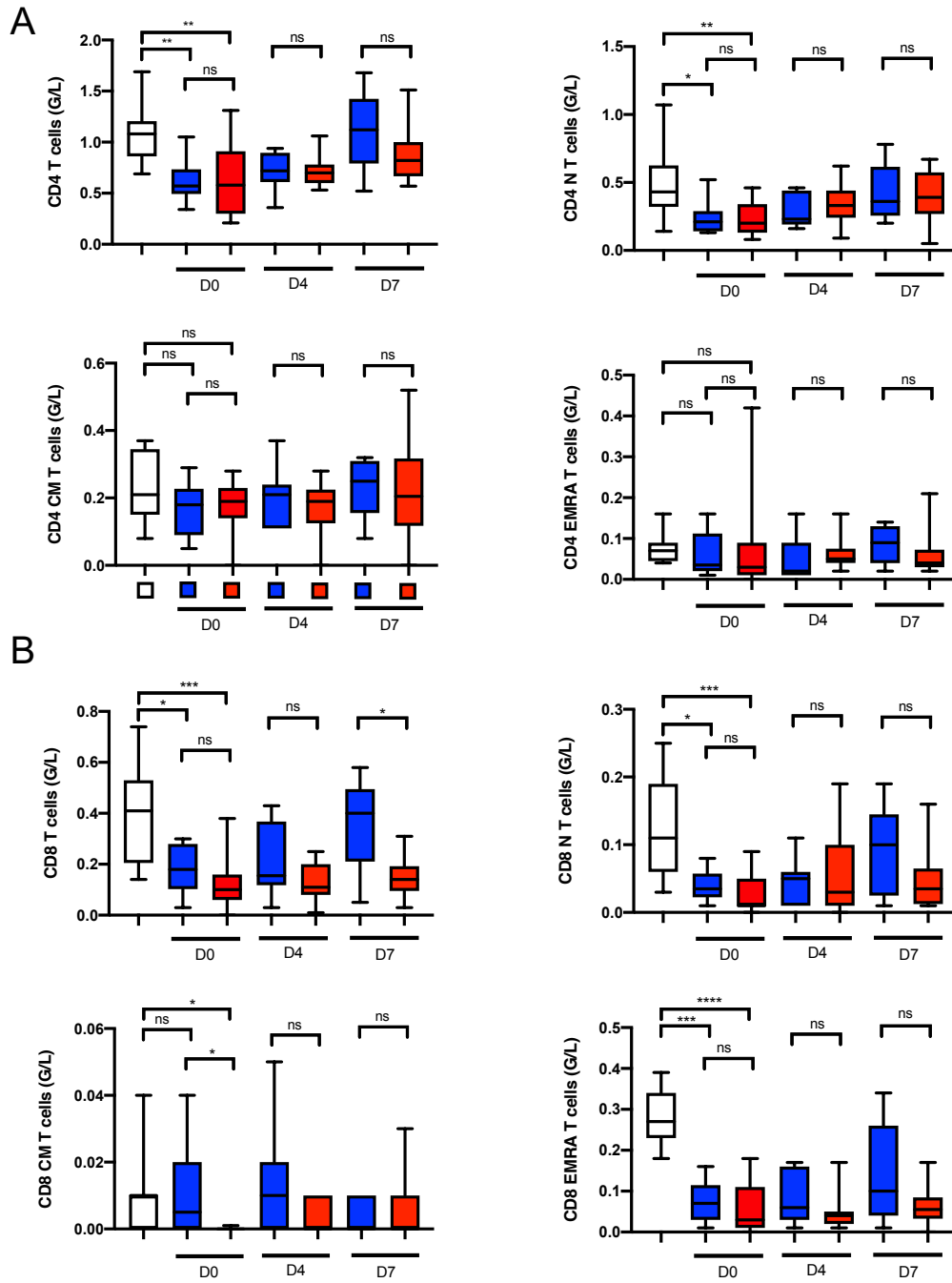
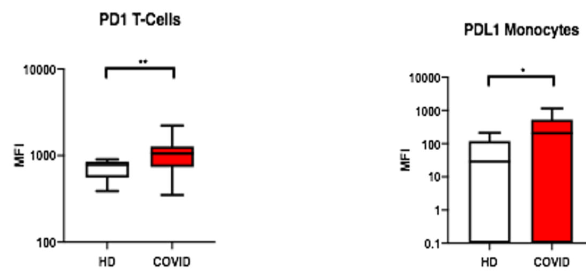


Figure E4



Discussion

Le sepsis est défini comme un dysfonctionnement d'organe secondaire à une réponse inappropriée de l'hôte envers une infection mettant en jeu le pronostic vital des patients. Bien que les dernières décennies aient été riches en avancées en termes de compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués, la survenue d'un sepsis demeure une des principales causes de décès avec une mortalité hospitalière évaluée à 30% dans sa forme la plus grave (choc septique). Les décès de patients au cours du sepsis peuvent être séparés en deux phases : une phase très précoce (décès dans les 24h après l'admission du patient) liée à de multiples facteurs (virulence de l'agent pathogène, caractéristiques de l'hôte) et une phase plus tardive (dans les semaines qui suivent l'admission du patient). Cette mortalité tardive n'est plus directement liée à l'agent pathogène responsable du sepsis mais aux conséquences immunologiques de cette infection grave. En effet, l'activation initiale du système immunitaire inné, étape incontournable de la clairance bactérienne, caractérisée par une sécrétion intense de médiateurs pro-inflammatoires, est concomitamment associée à un état d'immunoparalysie, également appelé syndrome de réponse anti inflammatoire compensatrice (CARS), qui persiste au cours du temps. De nombreuses modifications du système immunitaire ont été décrites. Parmi celles-ci, trois phénomènes sont associés à une augmentation significative de la mortalité des patients et la survenue d'infections secondaires (ou infections nosocomiales) : une majoration de l'apoptose lymphocytaire, une diminution de l'index de prolifération lymphocytaire et un recrutement des MDSC. Fort de ces constatations, diverses équipes se sont attelées à explorer les mécanismes responsables de ces phénomènes. Les travaux initiés dans le domaine de la cancérologie ont ainsi permis d'établir de nombreuses similitudes avec le sepsis comprenant notamment la survenue de défaillances immunométaboliques impliquant un déficit en arginine. Afin d'appréhender les mécanismes des décès imputables aux sepsis, les études animales ont permis de grandes avancées dans la compréhension des phénomènes impliqués.

Qualités et limites de notre modèle animal de sepsis

Au cours de ce projet nous avons opté pour un modèle murin de ponction ligature caecale. Au-delà de la simplicité et de l'utilisation très large de ce modèle (qualifié de gold standard) rendant reproductibles nos expérimentations, nous nous sommes efforcés de rendre le sepsis induit le plus proche possible de la réalité du sepsis humain. Les sujets subissant la première agression septique bénéficiaient en effet des thérapeutiques communément utilisées chez les patients hospitalisés pour une telle pathologie (réanimation hémodynamique, antibiothérapie, surveillance rapprochée). Le recours à l'ensemble de ces thérapeutiques nous a permis d'obtenir une mortalité proche de celle observée chez l'humain, de l'ordre de 20%. La seconde partie de ce modèle s'appuyant sur une infection respiratoire à *Staphylococcus aureus* est adaptée aux problématiques soulevées par les infections nosocomiales. Tout d'abord la temporalité (5 jours après la survenue de la CLP) reflète la cinétique de l'incidence des infections nosocomiales observées chez les patients hospitalisés pour un choc septique (survenue d'une pneumopathie nosocomiale tardive). Par ailleurs, les infections respiratoires secondaires sont prépondérantes tant en termes de fréquence que d'impact au sein de l'ensemble des infections nosocomiales.

Notre modèle est néanmoins imparfait sur un certain nombre d'aspects. Tout d'abord, les évaluations des dysfonctions d'organes induites par le sepsis n'ont été que parcellaires. Nous n'avons, en effet, pas exploré les atteintes des grands systèmes de nos sujets en dehors d'une analyse précise et objective des lésions pulmonaires. Alors que d'autres modèles se sont attelés à explorer l'ensemble des dysfonctions, en évaluant notamment les paramètres hémodynamiques, respiratoires, rénaux ou encore hépatiques des sujets. Ici nos évaluations des conséquences du sepsis se sont consacrées à une description fine de l'analyse pulmonaire ainsi qu'à un suivi du poids et de la survie. D'autre part, le processus de CLP associé aux réactions immunitaires septiques des réactions liées à la nécrose caecale et à l'agression chirurgicale qui peuvent limiter les conclusions quant à la causalité exclusive du sepsis au sein des mécanismes observés.

De la réalité aux implications du déficit en arginine

La régulation de la disponibilité des acides aminés essentiels et semi essentiels est l'un des mécanismes de régulation des fonctions immunitaires. La pénurie cellulaire en arginine est tout d'abord multifactorielle puisque issue d'une diminution de sa production (déficit d'apport et de synthèse) ainsi que d'une exacerbation de sa consommation (majoration de l'activité arginase). D'autre part, ses conséquences sont nombreuses et impliquent différents protagonistes. Au cours de ce travail nous avons axé nos explorations sur les conséquences lymphocytaires de ce déficit. Nos travaux ont permis tout d'abord d'objectiver la réalité de la diminution de la biodisponibilité en arginine au cours des états infectieux (qu'ils aient pour origine une infection bactérienne, au cours d'une CLP, ou encore virale dans le contexte du SDRA associé au COVID-19). Cet amenuisement de la quantité d'arginine est apparu associé à une augmentation de sa consommation (activité arginase) que l'on peut attribuer à une augmentation de la concentration des MDSC parmi les populations cellulaires circulantes. Concomitamment, le rôle de l'hypoargininémie au sein du CARS a pu être souligné notamment par le biais d'une majoration de l'apoptose lymphocytaire et d'une diminution de la capacité de ces cellules à proliférer *in vitro*. L'adéquation du modèle murin à la physiopathologie du sepsis chez l'Homme a souvent été mise en question, néanmoins notre étude sur les formes sévères de COVID-19 a permis d'objectiver des constatations similaires. Ces résultats permettent d'envisager le déficit en arginine en tant que cible thérapeutique au cours du sepsis. Afin de corriger ce déficit, nous avons eu recours à une supplémentation entérale en citrulline. Les avantages de cet immunonutriment, permettant notamment de mieux corriger l'hypoargininémie, font de la citrulline la thérapeutique idéale pour restaurer les dysfonctions induites par le déficit en arginine. Notre équipe a par ailleurs récemment envisagé l'utilisation cet acide aminé chez les patients non septiques de réanimation dans le cadre d'un essai clinique randomisé permettant de s'assurer de l'innocuité de cette thérapeutique.

Exploration mécanistique des dysfonctions lymphocytaires

L'approche mécanistique de dysfonctions lymphocytaires médiée par l'hypoargininémie (majoration de l'apoptose et diminution de la capacité à proliférer), proposée au cours de ce travail, s'appuie sur une étude du fonctionnement mitochondrial. L'analyse des fonctions mitochondriales de ces cellules après l'induction d'une péritonite polymicrobienne dans le cadre d'une CLP nous a permis d'objectiver la présence d'altérations de la respiration mitochondriale alors que le nombre de ces organites n'apparaissait pas diminué. Ces résultats abondent en faveur d'un déficit mitochondrial plus qualitatif que quantitatif. Si de telles constatations ont déjà été faites dans le domaine de l'immunosuppression liée aux pathologies tumorales, la présence de ces dysfonctions au cours d'un sepsis est, en revanche, relativement novatrice. Les altérations de leurs fonctions peuvent ainsi contribuer à la faillite énergétique des lymphocytes T, responsable d'un accroissement de l'apoptose ainsi que d'une diminution de prolifération de ces cellules.

Outre ces effets sur les populations lymphocytaires T, divers contingents cellulaires participant au CARS pourraient bénéficier d'une restauration du niveau d'arginine. Nous avons ainsi parallèlement évalué les conséquences de ce déficit sur le recrutement des lymphocytes B régulateurs spléniques (CD39⁺) après induction d'une CLP (**Figure 16**). Les résultats préliminaires de ce travail objectivent, là encore, une réduction de la concentration splénique de ces populations immunosuppressives.

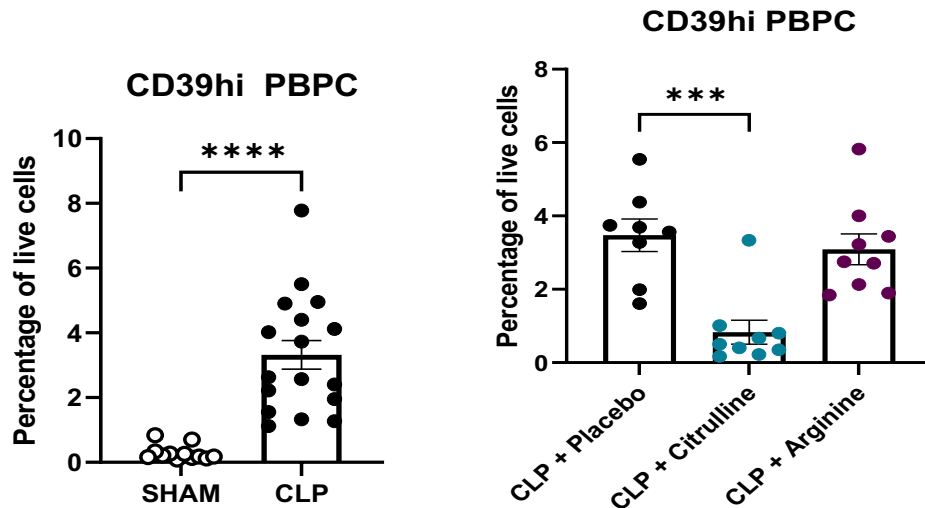


Figure 16. Évaluation de la proportion de lymphocytes B spléniques CD39⁺

Le sepsis induit une expansion des cellules B spléniques CD39⁺. Une immunonutrition entérale par citrulline limite l'expansion de cette population immunosuppressive.

La sélection des patients : Étape incontournable

Parmi les thérapeutiques envisagées afin de limiter les conséquences du CARS, l'immunonutrition constitue une approche intéressante. L'apport de pharmanutriments aux propriétés immunomodulatrices pourrait restaurer le déficit immunitaire acquis en réanimation. Malheureusement, l'essentiel des études conduites axées sur l'immunonutrition n'a apporté, jusqu'à présent, que des résultats non concluants. Cette stratégie, en réanimation, n'a, pour le moment, pas démontré d'effet bénéfique sur les défaillances d'organes, l'acquisition des infections nosocomiales ni la mortalité. Cependant les nombreux écueils méthodologiques (utilisation de plusieurs pharmanutriments, ensemble très hétérogène de patients) et l'absence de données cliniques ne permettent pas, jusqu'à présent, la moindre conclusion quant à l'utilité ou à la dangerosité d'une telle approche chez les patients admis en réanimation pour un sepsis. Nous nous sommes attachés à envisager l'immunonutrition sous un angle nouveau au cours de ce projet. Tout d'abord en standardisant cette approche tant dans le choix de la population étudiée (sepsis par CLP et pneumopathies à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline au cours

du modèle animal permettant l'obtention de sujets relativement homogènes) que dans les critères de jugements utilisés (composés d'analyses des fonctions immunologiques à un temps donné mais aussi des conséquences locales et systémiques des infections secondaires). L'ensemble des résultats exposés au cours de ce projet s'appuie sur des explorations réalisées chez des sujets (humains ou murins) pour lesquels l'agression septique est d'origine « communautaire » et relativement récente. Ces données ne sont donc pas applicables aux patients déjà hospitalisés depuis un certain temps admis secondairement en réanimation et plaident en faveur d'une sélection des patients (« communautaires uniquement ») afin d'évaluer les potentiels bénéfiques de l'immunonutrition. Par ailleurs, bien qu'ayant réalisé nos expérimentations uniquement chez des sujets indemnes d'immunodépression préalable, les analogies entre les pathologies oncologiques et le sepsis suggèrent l'ampleur des bénéfices attendus chez les patients souffrant de pathologies hémato-cancérologiques développant un sepsis.

La pandémie liée au SARS-COV2 : Une opportunité ?

Au-delà du bouleversement sanitaire, la survenue de la pandémie de COVID-19 constitue une opportunité au sein de l'exploration des mécanismes du sepsis et de ses perspectives thérapeutiques. Les explorations immunologiques d'une importante cohorte de patients relativement homogènes ont permis d'appréhender les mécanismes responsables de la lymphopénie caractéristique des formes sévères de COVID-19. Cliniciens et chercheurs ont alors précocement pu objectiver les nombreuses similarités entre sepsis bactérien et COVID-19. Cependant, à la différence d'une infection bactérienne, les traitements ayant pour but une destruction directe de l'agent pathogènes (antibiotiques dans les sepsis bactériens), même après 2 années de recherches intensives, demeurent le maillon faible de l'arsenal thérapeutique contre le SARS-CoV-2. Découle de cette faiblesse, chez certains patients, la persistance d'une répllication virale et de lésions tissulaires (notamment pulmonaires) qui sont responsables d'un allongement du séjour de ces patients en unités de soins critiques et d'une augmentation de l'exposition au risque d'infections

nosocomiales. Ces infections sont attribuables à un large panel de pathogènes comportant notamment des pathogènes habituellement qualifiés d'opportunistes puisqu'ils ne deviennent pathogènes uniquement chez les patients dont le système immunitaire est sévèrement débilisé (aspergilloses, mucormycoses). Si par le passé la mortalité attribuable à ces infections secondaires a pu être débattue, elle est aujourd'hui communément admise. Cette influence sur le pronostic des patients semble, en effet, dorénavant essentielle, *a fortiori* chez des patients exposés à une ventilation mécanique prolongée comme le sont les patients atteints de formes sévères de COVID-19.

Les effets de la correction de l'hypoargininémie ont pu être approchés au cours de l'étude menée chez des patients atteints de COVID-19. Nous avons, en effet, observé une correction des défauts de prolifération lymphocytaire après enrichissement du milieu de culture en arginine suggérant un effet bénéfique attendu chez ces patients. Ces résultats nous ont ainsi amené à envisager un essai clinique d'immunonutrition au cours des formes sévères de COVID-19, s'appuyant sur un apport entéral de citrulline pendant 7 jours après l'admission en réanimation. Les résultats préliminaires de ce travail suggèrent une tendance à l'amélioration du score de défaillances d'organes (SOFA) ainsi qu'une diminution significative de la proportion de patients pour lesquels les PCR respiratoires détectant le SARS-CoV2 demeuraient positives à J14 (**Figure 17**). Nous nous attelons actuellement à explorer les mécanismes de cette meilleure clairance virale.

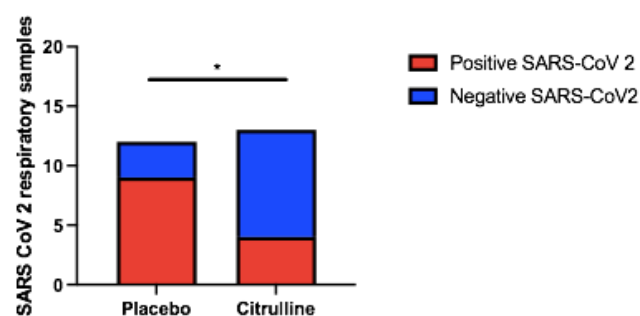


Figure 17. Evaluation de la clairance virale au cours du SDRA secondaire au SARS-CoV2

Proportions de patients ayant des PCR respiratoires SARS-CoV2 positives à J14 selon qu'ils aient ou non été traités par de la citrulline.

Conclusion et perspectives

La conception des armes thérapeutiques au cours des pathologies néoplasiques a été bouleversée au cours des dernières décennies notamment grâce à l'essor de traitements visant à restaurer les fonctions immunitaires. Ces évolutions ont permis une amélioration drastique du pronostic des patients. Fort laisse à penser que le sepsis, partageant de nombreux mécanismes immunosuppresseurs avec les pathologies néoplasiques, pourrait également bénéficier de ce changement de paradigme. En effet, la stagnation des taux de mortalité au cours des états infectieux suggère la fin de l'ère de la quête du traitement qui éradiquera directement le pathogène impliqué. Nos travaux laissent entrevoir l'opportunité d'un soutien du système immunitaire et de la prévention du CARS.

Outre une moindre clairance du pathogène responsable du sepsis comportant un risque inhérent d'aggravation de l'état du patient, nous avons pu observer que la susceptibilité exacerbée aux infections acquises est essentielle puisque fréquemment observée ainsi qu'affectant le pronostic des patients. Alors que les études se sont, jusqu'à présent, principalement consacrées à l'évaluation de la mortalité des patients septiques, l'ampleur des conséquences des infections secondairement acquises suggère la nécessité de considérer ces infections en tant que critère d'évaluation majeur des essais thérapeutiques de demain.

Enfin la gestion uniforme du sepsis apparaît aujourd'hui moins adaptée à la complexité de ces patients hétérogènes. La place de l'immunonutrition au cours du sepsis pourra certainement s'intégrer dans une démarche de médecine personnalisée au cours de laquelle l'immunomonitoring de ces patients critiques joue un rôle essentiel.

Références bibliographiques

1. Majno, G. The Ancient Riddle of $\sigma\eta\psi\iota\zeta$ (Sepsis). *J. Infect. Dis.* **163**, 937–945 (1991).
2. Funk, D. J., Parrillo, J. E. & Kumar, A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit. Care Clin.* **25**, 83–101, viii (2009).
3. Bone, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**, 1644–1655 (1992).
4. Kaukonen, K.-M., Bailey, M., Pilcher, D., Cooper, D. J. & Bellomo, R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1629–1638 (2015).
5. Vincent, J.-L., Opal, S. M., Marshall, J. C. & Tracey, K. J. Sepsis definitions: time for change. *Lancet Lond. Engl.* **381**, 774–775 (2013).
6. Levy, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* **31**, 1250–1256 (2003).
7. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
8. Rudd, K. E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* **395**, 200–211 (2020).
9. Kaukonen, K.-M., Bailey, M., Suzuki, S., Pilcher, D. & Bellomo, R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000–2012. *JAMA* **311**, 1308–1316 (2014).
10. Fleischmann-Struzek, C. *et al.* Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Med.* **44**, 1826–1835 (2018).
11. Liu, V. *et al.* Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *JAMA* **312**, 90–92 (2014).
12. van Vught, L. A. *et al.* Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA* **315**, 1469–1479 (2016).
13. Delano, M. J. & Ward, P. A. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J. Clin. Invest.* **126**, 23–31 (2016).
14. Vincent, J.-L. *et al.* Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA* **323**, 1478–1487 (2020).
15. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1546–1554 (2003).
16. Leligowicz, A. *et al.* Association between source of infection and hospital mortality in patients who have septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 1204–1213 (2014).
17. Pollán, M. *et al.* Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *The Lancet* **396**, 535–544 (2020).
18. Zahar, J.-R. *et al.* Outcomes in severe sepsis and patients with septic shock: pathogen species and infection sites are not associated with mortality. *Crit. Care Med.* **39**,

1886–1895 (2011).

19. Blanco, J. *et al.* Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit. Care Lond. Engl.* **12**, R158 (2008).
20. Vincent, J.-L. *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* **34**, 344–353 (2006).
21. Lin, G.-L., McGinley, J. P., Drysdale, S. B. & Pollard, A. J. Epidemiology and Immune Pathogenesis of Viral Sepsis. *Front. Immunol.* **9**, 2147 (2018).
22. Causes and outcomes of sepsis in southeast Asia: a multinational multicentre cross-sectional study - The Lancet Global Health.
[https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(17\)30007-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(17)30007-4/fulltext).
23. World malaria report 2020. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240015791>.
24. Magill, S. S. *et al.* Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1732–1744 (2018).
25. Mayr, F. B., Yende, S. & Angus, D. C. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* **5**, 4–11 (2014).
26. Koehler, P. *et al.* Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**, 1200–1212 (2019).
27. Chertov, O., Yang, D., Howard, O. M. & Oppenheim, J. J. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol. Rev.* **177**, 68–78 (2000).
28. Wagner, C. *et al.* Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* **103**, 1099–1104 (2004).
29. Gong, T., Liu, L., Jiang, W. & Zhou, R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 95–112 (2020).
30. Mosser, D. M., Hamidzadeh, K. & Goncalves, R. Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 579–587 (2021).
31. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
32. China, P. R. O. Eosinophils function as antigen-presenting cells Huan-Zhong Shi 1 Departments of Respiratory and Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University,.
33. Linch, S. N. *et al.* Mouse Eosinophils Possess Potent Antibacterial Properties In Vivo. *Infect. Immun.* **77**, 4976–4982 (2009).
34. Kumar, V. Natural killer cells in sepsis: Underprivileged innate immune cells. *Eur. J. Cell Biol.* **98**, 81–93 (2019).
35. Guo, R.-F. & Ward, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 821–852 (2005).
36. Reis, E. S., Mastellos, D. C., Hajishengallis, G. & Lambris, J. D. New Insights into the Immune Functions of Complement. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 503–516 (2019).
37. Kumar, B. V., Connors, T. J. & Farber, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* **48**, 202–213 (2018).
38. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
39. Jandus, C., Usatorre, A. M., Viganò, S., Zhang, L. & Romero, P. The Vast Universe of T Cell Diversity: Subsets of Memory Cells and Their Differentiation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1514**, 1–17 (2017).
40. Gattinoni, L. *et al.* A human memory T-cell subset with stem cell-like properties.

Nat. Med. **17**, 1290–1297 (2011).

41. Hamann, D. *et al.* Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1407–1418 (1997).
42. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–532 (2008).
43. Ashour, H. M. & Seif, T. M. The.
44. Mauri, C. & Bosma, A. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 221–41 (2011).
45. Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* **3**, 944–950 (2002).
46. Mogensen, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 240–273, Table of Contents (2009).
47. Hotchkiss, R. S. *et al.* Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16045 (2016).
48. Gustave, C.-A. *et al.* Septic Shock Shapes B Cell Response toward an Exhausted-like/Immune Regulatory Profile in Patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **200**, 2418–2425 (2018).
49. Fidler, I. J. Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. 11.
50. Almand, B. *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 678–689 (2001).
51. Uhel, F. *et al.* Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 315–327 (2017).
52. Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M. & Gabrilovich, D. I. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearing Mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 5791–5802 (2008).
53. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162–174 (2009).
54. Talmadge, J. E. & Gabrilovich, D. I. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 739–752 (2013).
55. Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 253–268 (2012).
56. Manz, M. G. & Boettcher, S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 302–314 (2014).
57. E, G. *et al.* Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit. Care Med.* **42**, (2014).
58. Chishti, A. D., Shenton, B. K., Kirby, J. A. & Baudouin, S. V. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med.* **30**, 605–611 (2004).
59. Daix, T. *et al.* Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest* **154**, 617–627 (2018).
60. Camicia, G., Pozner, R. & de Larrañaga, G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock Augusta Ga* **42**, 286–294 (2014).
61. Venet, F. *et al.* Increased circulating regulatory T cells (CD4⁺)CD25⁺CD127⁻) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* **35**, 678–686 (2009).
62. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O’Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683–765 (2001).

63. Shen, P. *et al.* IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* **507**, 366–370 (2014).
64. Parekh, V. V. *et al.* B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8⁺ T cells: role of TGF- β 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 5897–5911 (2003).
65. Nascimento, D. C. *et al.* Sepsis expands a CD39⁺ plasmablast population that promotes immunosuppression via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. *Immunity* **54**, 2024–2041.e8 (2021).
66. Adrie, C. *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* **7**, 30 (2017).
67. Drewry, A. M. *et al.* Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock Augusta Ga* **42**, 383–391 (2014).
68. Venet, F. *et al.* Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock Augusta Ga* **34**, 358–363 (2010).
69. Le Tulzo, Y. *et al.* Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock Augusta Ga* **18**, 487–494 (2002).
70. Li, T. *et al.* Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. *J. Infect. Dis.* **189**, 648–651 (2004).
71. Kamphuis, E., Junt, T., Waibler, Z., Forster, R. & Kalinke, U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* **108**, 3253–3261 (2006).
72. Hotchkiss, R. S. *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* **27**, 1230–1251 (1999).
73. Hotchkiss, R. S. *et al.* Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 6952–6963 (2001).
74. Hotchkiss, R. S. *et al.* Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 5110–5118 (2005).
75. Girardot, T., Rimmelé, T., Venet, F. & Monneret, G. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **22**, 295–305 (2017).
76. Venet, F. *et al.* Increased percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4⁺CD25⁻ lymphocytes. *Crit. Care Med.* **32**, 2329–2331 (2004).
77. Venet, F. *et al.* Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 523–535 (2008).
78. Jorgensen, I., Rayamajhi, M. & Miao, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 151–164 (2017).
79. Albert, M. L. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 223–231 (2004).
80. Henson, P. M. & Bratton, D. L. Antiinflammatory effects of apoptotic cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 2773–2774 (2013).
81. Hotchkiss, R. S. & Nicholson, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 813–822 (2006).
82. Inoue, S. *et al.* Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care Lond. Engl.* **18**, R130 (2014).
83. Venet, F. *et al.* IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 5073–5081 (2012).

84. Guignant, C. *et al.* Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care Lond. Engl.* **15**, R99 (2011).
85. Boomer, J. S., Shuherk-Shaffer, J., Hotchkiss, R. S. & Green, J. M. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit. Care* **16**, R112 (2012).
86. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
87. Adams, J. L., Smothers, J., Srinivasan, R. & Hoos, A. Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 603–622 (2015).
88. Poujol, F., Monneret, G., Pachot, A., Textoris, J. & Venet, F. Altered T Lymphocyte Proliferation upon Lipopolysaccharide Challenge Ex Vivo. *PloS One* **10**, e0144375 (2015).
89. Darcy, C. J. *et al.* Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit. Care Lond. Engl.* **18**, R163 (2014).
90. Delano, M. J. *et al.* MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J. Exp. Med.* **204**, 1463–1474 (2007).
91. Unsinger, J. *et al.* IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 3768–3779 (2010).
92. Chang, K. C. *et al.* Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* **17**, R85 (2013).
93. Hotchkiss, R. S. *et al.* Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14541–14546 (1999).
94. Otto, G. P. *et al.* The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit. Care Lond. Engl.* **15**, R183 (2011).
95. Schauwvlieghe, A. F. A. D. *et al.* Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* **6**, 782–792 (2018).
96. Gangneux, J.-P. *et al.* Fungal infections in mechanically ventilated patients with COVID-19 during the first wave: the French multicentre MYCOVID study. *Lancet Respir. Med.* **10**, 180–190 (2022).
97. Monneret, G., Venet, F., Kullberg, B.-J. & Netea, M. G. ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med. Mycol.* **49 Suppl 1**, S17-23 (2011).
98. Walton, A. H. *et al.* Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PloS One* **9**, e98819 (2014).
99. Imlay, H. & Limaye, A. P. Current Understanding of Cytomegalovirus Reactivation in Critical Illness. *J. Infect. Dis.* **221**, S94–S102 (2020).
100. Luyt, C.-E. *et al.* Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 935–942 (2007).
101. Limaye, A. P. *et al.* Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* **300**, 413–422 (2008).
102. Papazian, L. *et al.* Cytomegalovirus. An unexpected cause of ventilator-associated pneumonia. *Anesthesiology* **84**, 280–287 (1996).
103. Ong, D. S. Y. *et al.* Epidemiology of Multiple Herpes Viremia in Previously Immunocompetent Patients With Septic Shock. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **64**, 1204–1210 (2017).
104. Bone, R. C., Grodzin, C. J. & Balk, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* **112**, 235–243 (1997).

105. Hotchkiss, R. S., Coopersmith, C. M., McDunn, J. E. & Ferguson, T. A. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* **15**, 496–497 (2009).
106. van der Poll, T., Shankar-Hari, M. & Wiersinga, W. J. The immunology of sepsis. *Immunity* **54**, 2450–2464 (2021).
107. Vincent, J. L. *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* **22**, 707–710 (1996).
108. Raith, E. P. *et al.* Prognostic Accuracy of the SOFA Score, SIRS Criteria, and qSOFA Score for In-Hospital Mortality Among Adults With Suspected Infection Admitted to the Intensive Care Unit. *JAMA* **317**, 290–300 (2017).
109. Parikh, S. M. Dysregulation of the angiotensin–Tie-2 axis in sepsis and ARDS. *Virulence* **4**, 517–524 (2013).
110. Thompson, B. T., Chambers, R. C. & Liu, K. D. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **377**, 562–572 (2017).
111. Robinson, K. M. *et al.* Survival during influenza-associated bacterial superinfection improves following viral- and bacterial-specific monoclonal antibody treatment. *JCI Insight* **4**, 125554 (2019).
112. Lagu, T. *et al.* Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit. Care Med.* **40**, 754–761 (2012).
113. Jiao, Y. *et al.* Exosomal miR-30d-5p of neutrophils induces M1 macrophage polarization and primes macrophage pyroptosis in sepsis-related acute lung injury. *Crit. Care Lond. Engl.* **25**, 356 (2021).
114. Kangelaris, K. N. *et al.* Increased expression of neutrophil-related genes in patients with early sepsis-induced ARDS. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **308**, L1102–L1113 (2015).
115. Park, I. *et al.* Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. *Eur. Respir. J.* **53**, 1800786 (2019).
116. Dolinay, T. *et al.* Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 1225–1234 (2012).
117. Bachofen, M. & Weibel, E. R. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **116**, 589–615 (1977).
118. Lelubre, C. & Vincent, J.-L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat. Rev. Nephrol.* **14**, 417–427 (2018).
119. Daviaud, F. *et al.* Timing and causes of death in septic shock. *Ann. Intensive Care* **5**, 16 (2015).
120. Grimaldi, D. *et al.* Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* **37**, 1438–1446 (2011).
121. Prescott, H. C., Langa, K. M., Liu, V., Escobar, G. J. & Iwashyna, T. J. Increased 1-year healthcare use in survivors of severe sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 62–69 (2014).
122. Monneret, G., Venet, F., Pachot, A. & Lepape, A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med. Camb. Mass* **14**, 64–78 (2008).
123. Landelle, C. *et al.* Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* **36**, 1859–1866 (2010).
124. Le Tulzo, Y. *et al.* Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional

- downregulation by cortisol during septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 1144–1151 (2004).
125. Wijnands, K. A. P., Castermans, T. M. R., Hommen, M. P. J., Meesters, D. M. & Poeze, M. Arginine and Citrulline and the Immune Response in Sepsis. *Nutrients* **7**, 1426–1463 (2015).
126. Morris, S. M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 922–930 (2009).
127. Martí i Líndez, A.-A. & Reith, W. Arginine-dependent immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 5303–5324 (2021).
128. Luiking, Y. C., Poeze, M., Ramsay, G. & Deutz, N. E. P. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 142–152 (2009).
129. Wu, G. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *Am. J. Physiol.* **272**, G1382–1390 (1997).
130. Tizianello, A., De Ferrari, G., Garibotto, G., Gurreri, G. & Robaudo, C. Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. *J. Clin. Invest.* **65**, 1162–1173 (1980).
131. Modolell, M. *et al.* Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e480 (2009).
132. Freund, H., Atamian, S., Holroyde, J. & Fischer, J. E. Plasma Amino Acids as Predictors of the Severity and Outcome of Sepsis. *Ann. Surg.* **190**, 571–576 (1979).
133. Osunkoya, B. O., Adler, W. H. & Smith, R. T. Effect of arginine deficiency on synthesis of DNA and immunoglobulin receptor of Burkitt lymphoma cells. *Nature* **227**, 398–399 (1970).
134. Chang, C. I., Liao, J. C. & Kuo, L. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res.* **61**, 1100–1106 (2001).
135. Lemos, H., Huang, L., Prendergast, G. C. & Mellor, A. L. Immune control by amino acid catabolism during tumorigenesis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 162–175 (2019).
136. Rodriguez, P. C. *et al.* Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* **64**, 5839–5849 (2004).
137. Barile, M. F. & Leventhal, B. G. Possible mechanism for Mycoplasma inhibition of lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin. *Nature* **219**, 750–752 (1968).
138. Zabaleta, J. *et al.* Helicobacter pylori arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 586–593 (2004).
139. Rodriguez, P. C. *et al.* L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 1232–1239 (2003).
140. Minami, Y., Weissman, A. M., Samelson, L. E. & Klausner, R. D. Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2688–2692 (1987).
141. Munder, M., Choi, B.-S., Rogers, M. & Kropf, P. l-Arginine deprivation impairs Leishmania major-specific T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2161–2172 (2009).
142. Ghosh, M. *et al.* Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* **304**, 743–746 (2004).
143. Ochoa, J. B. *et al.* Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **25**, 23–29 (2001).
144. Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G. & Ochoa, A. C. L-arginine availability regulates T-

- lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* **109**, 1568–1573 (2007).
145. de Jonge, W. J. *et al.* Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **110**, 1539–1548 (2002).
146. Zea, A. H. *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* **65**, 3044–3048 (2005).
147. Gey, A. *et al.* Granulocytic myeloid-derived suppressor cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill patients. *Clin. Exp. Immunol.* **180**, 280–288 (2015).
148. Geiger, R. *et al.* L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* **167**, 829–842.e13 (2016).
149. Cheng, C.-T. *et al.* Arginine starvation kills tumor cells through aspartate exhaustion and mitochondrial dysfunction. *Commun. Biol.* **1**, 178 (2018).
150. Changou, C. A. *et al.* Arginine starvation-associated atypical cellular death involves mitochondrial dysfunction, nuclear DNA leakage, and chromatin autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 14147–14152 (2014).
151. Arulkumaran, N. *et al.* Mitochondrial Function in Sepsis. *Shock Augusta Ga* **45**, 271–281 (2016).
152. Angajala, A. *et al.* Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front. Immunol.* **9**, 1605 (2018).
153. Hotchkiss, R. S. *et al.* Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 5110–5118 (2005).
154. Srinivasan, S. & Avadhani, N. G. Cytochrome c Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1252–1263 (2012).
155. Bauer, I. & Pannen, B. H. J. Bench-to-bedside review: Carbon monoxide--from mitochondrial poisoning to therapeutic use. *Crit. Care Lond. Engl.* **13**, 220 (2009).
156. Brealey, D. *et al.* Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet Lond. Engl.* **360**, 219–223 (2002).
157. Takasu, O. *et al.* Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 509–517 (2013).
158. Carré, J. E. *et al.* Survival in Critical Illness Is Associated with Early Activation of Mitochondrial Biogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 745–751 (2010).
159. Deitch, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock Augusta Ga* **24 Suppl 1**, 19–23 (2005).
160. Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N. & Sannomiya, P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock Augusta Ga* **30 Suppl 1**, 53–59 (2008).
161. Liaudet, L. *et al.* Comparison of Inflammation, Organ Damage, and Oxidant Stress Induced by Salmonella enterica Serovar Muenchen Flagellin and Serovar Enteritidis Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **70**, 192–198 (2002).
162. Wichterman, K. A., Baue, A. E. & Chaudry, I. H. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* **29**, 189–201 (1980).
163. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* **4**, 31–36 (2009).
164. Hyde, S. R., Stith, R. D. & McCallum, R. E. Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice. *Infect. Immun.* **58**, 619–624 (1990).
165. Zantl, N. *et al.* Essential Role of Gamma Interferon in Survival of Colon Ascendens Stent Peritonitis, a Novel Murine Model of Abdominal Sepsis. *Infect. Immun.* **66**, 2300–2309 (1998).
166. Buras, J. A., Holzmann, B. & Sitkovsky, M. Animal models of sepsis: setting the

- stage. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 854–865 (2005).
167. Starr, M. E. *et al.* A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term reproducibility for animal models of sepsis. *PLoS One* **9**, e115705 (2014).
168. Gentile, L. F. *et al.* Host responses to sepsis vary in different low-lethality murine models. *PLoS One* **9**, e94404 (2014).
169. Chen, M. *et al.* Ghrelin attenuates drowning injury via dual effects on damage protection and immune repression. *Ann. Transl. Med.* **9**, 920 (2021).
170. Vollmer, J. & Krieg, A. M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 195–204 (2009).
171. Meng, G. *et al.* Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J. Clin. Invest.* **113**, 1473–1481 (2004).
172. Coopersmith, C. M. *et al.* Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA* **287**, 1716–1721 (2002).
173. Steinhäuser, M. L. *et al.* IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 392–399 (1999).
174. Hagberg, L. *et al.* Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infect. Immun.* **40**, 273–283 (1983).
175. Ruiz, S. *et al.* Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Med. Exp.* **4**, 22 (2016).
176. Zingarelli, B. *et al.* PART I: MINIMUM QUALITY THRESHOLD IN PRE-CLINICAL SEPSIS STUDIES (MQTiPSS) FOR STUDY DESIGN AND HUMANE MODELING ENDPOINTS. *Shock Augusta Ga* **51**, 10–22 (2019).
177. Osuchowski, M. F., Craciun, F., Weixelbaumer, K. M., Duffy, E. R. & Remick, D. G. Sepsis chronically in MARS: systemic cytokine responses are always mixed regardless of the outcome, magnitude, or phase of sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 4648–4656 (2012).
178. Pugh, A. M., Auteri, N. J., Goetzman, H. S., Caldwell, C. C. & Nomellini, V. A Murine Model of Persistent Inflammation, Immune Suppression, and Catabolism Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, E1741 (2017).
179. Grégoire, M. *et al.* Frontline Science: HMGB1 induces neutrophil dysfunction in experimental sepsis and in patients who survive septic shock. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 1281–1287 (2017).
180. Hellman, J. *et al.* Part III: Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies (MQTiPSS) for Fluid Resuscitation and Antimicrobial Therapy Endpoints. *Shock Augusta Ga* **51**, 33–43 (2019).
181. Walley, K. R., Lukacs, N. W., Standiford, T. J., Strieter, R. M. & Kunkel, S. L. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect. Immun.* **64**, 4733–4738 (1996).
182. Libert, C. *et al.* Part II: Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies (MQTiPSS) for Types of Infections and Organ Dysfunction Endpoints. *Shock Augusta Ga* **51**, 23–32 (2019).
183. Matute-Bello, G. *et al.* An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 725–738 (2011).
184. Razavi, H. M. *et al.* Pulmonary oxidant stress in murine sepsis is due to inflammatory cell nitric oxide. *Crit. Care Med.* **33**, 1333–1339 (2005).
185. Muenzer, J. T. *et al.* Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant ‘two-hit’ model of sepsis. *Shock Augusta Ga* **26**, 565–570 (2006).
186. Guillon, A. *et al.* Preclinical septic shock research: why we need an animal ICU. *Ann. Intensive Care* **9**, 66 (2019).

187. Osuchowski, M. F. *et al.* Abandon the mouse research ship? Not just yet! *Shock Augusta Ga* **41**, 463–475 (2014).
188. Osuchowski, M. F. *et al.* Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies (MQTiPSS): An International Expert Consensus Initiative for Improvement of Animal Modeling in Sepsis. *Shock Augusta Ga* **50**, 377–380 (2018).
189. Tao, L. & Reese, T. A. Making Mouse Models That Reflect Human Immune Responses. *Trends Immunol.* **38**, 181–193 (2017).
190. Dyson, A. & Singer, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit. Care Med.* **37**, S30-37 (2009).
191. Esmon, C. T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit. Care Med.* **32**, S219-222 (2004).
192. Manzanares, W., Dhaliwal, R., Jiang, X., Murch, L. & Heyland, D. K. Antioxidant micronutrients in the critically ill: a systematic review and meta-analysis. *Crit. Care Lond. Engl.* **16**, R66 (2012).
193. Moynard, C. *et al.* Arginine reduces bacterial invasion in rats with head injury: an in vivo evaluation by bioluminescence. *Crit. Care Med.* **40**, 278–280 (2012).
194. Rice, T. W. Immunonutrition in critical illness: limited benefit, potential harm. *JAMA* **312**, 490–491 (2014).
195. Heyland, D. *et al.* A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1489–1497 (2013).
196. van Zanten, A. R. H. *et al.* High-protein enteral nutrition enriched with immune-modulating nutrients vs standard high-protein enteral nutrition and nosocomial infections in the ICU: a randomized clinical trial. *JAMA* **312**, 514–524 (2014).
197. Tadié, J.-M. *et al.* Arginine administration to critically ill patients with a low nitric oxide fraction in the airways: a pilot study. *Intensive Care Med.* **39**, 1663–1665 (2013).
198. Agarwal, U., Didelija, I. C., Yuan, Y., Wang, X. & Marini, J. C. Supplemental Citrulline Is More Efficient Than Arginine in Increasing Systemic Arginine Availability in Mice. *J. Nutr.* **147**, 596–602 (2017).
199. Collins, J. K. *et al.* Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **23**, 261–266 (2007).
200. Bahri, S. *et al.* Citrulline: from metabolism to therapeutic use. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **29**, 479–484 (2013).
201. Schwedhelm, E. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **65**, 51–59 (2008).
202. Asgeirsson, T. *et al.* Citrulline: a potential immunomodulator in sepsis. *Surgery* **150**, 744–751 (2011).
203. Wijnands, K. A. P. *et al.* Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PloS One* **7**, e37439 (2012).
204. Kaore, S. N., Amame, H. S. & Kaore, N. M. Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **27**, 35–50 (2013).
205. Guan, W.-J. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1708–1720 (2020).
206. Berlin, D. A., Gulick, R. M. & Martinez, F. J. Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2451–2460 (2020).
207. Gupta, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 1017–1032 (2020).
208. Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 363–374

- (2020).
209. Wang, D. *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* **323**, 1061–1069 (2020).
 210. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* **395**, 497–506 (2020).
 211. Liu, J. *et al.* Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* **55**, 102763 (2020).
 212. Chen, G. *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Invest.* **130**, 2620–2629 (2020).
 213. Merad, M. & Martin, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 355–362 (2020).
 214. Wang, F. *et al.* Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J. Infect. Dis.* **221**, 1762–1769 (2020).
 215. Diao, B. *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* **11**, 827 (2020).
 216. Liao, M. *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 842–844 (2020).
 217. Xu, Z. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* **8**, 420–422 (2020).
 218. Adamo, S. *et al.* Profound dysregulation of T cell homeostasis and function in patients with severe COVID-19. *Allergy* **76**, 2866–2881 (2021).
 219. Hadjadj, J. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* **369**, 718–724 (2020).
 220. Agrati, C. *et al.* Expansion of myeloid-derived suppressor cells in patients with severe coronavirus disease (COVID-19). *Cell Death Differ.* **27**, 3196–3207 (2020).
 221. Falck-Jones, S. *et al.* Functional monocytic myeloid-derived suppressor cells increase in blood but not airways and predict COVID-19 severity. *J. Clin. Invest.* **131**, 144734 (2021).
 222. Vitte, J. *et al.* A Granulocytic Signature Identifies COVID-19 and Its Severity. *J. Infect. Dis.* **222**, 1985–1996 (2020).
 223. Thompson, E. A. *et al.* Metabolic programs define dysfunctional immune responses in severe COVID-19 patients. *Cell Rep.* **34**, 108863 (2021).
 224. Rowlands, M., Segal, F. & Hartl, D. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in COVID-19. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
 225. Rees, C. A. *et al.* Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, (2021).
 226. Fiorentino, G. *et al.* Effects of adding L-arginine orally to standard therapy in patients with COVID-19: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. Results of the first interim analysis. *EClinicalMedicine* **40**, (2021).
 227. COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network and the COVID-ICU Investigators. Clinical characteristics and day-90 outcomes of 4244 critically ill adults with COVID-19: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* **47**, 60–73 (2021).
 228. Rouzé, A. *et al.* Relationship between SARS-CoV-2 infection and the incidence of ventilator-associated lower respiratory tract infections: a European multicenter cohort study. *Intensive Care Med.* **47**, 188–198 (2021).
 229. Maes, M. *et al.* Ventilator-associated pneumonia in critically ill patients with COVID-19. *Crit. Care Lond. Engl.* **25**, 25 (2021).
 230. Buetti, N. *et al.* COVID-19 increased the risk of ICU-acquired bloodstream infections: a case-cohort study from the multicentric OUTCOMEREA network. *Intensive*

- Care Med.* **47**, 180–187 (2021).
231. Massart, N. *et al.* Characteristics and prognosis of bloodstream infection in patients with COVID-19 admitted in the ICU: an ancillary study of the COVID-ICU study. *Ann. Intensive Care* **11**, 183 (2021).
232. Nseir, S. *et al.* Relationship between ventilator-associated pneumonia and mortality in COVID-19 patients: a planned ancillary analysis of the coVAPid cohort. *Crit. Care Lond. Engl.* **25**, 177 (2021).
233. White, P. L. *et al.* A national strategy to diagnose COVID-19 associated invasive fungal disease in the ICU. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* (2020) doi:10.1093/cid/ciaa1298.
234. Bartoletti, M. *et al.* Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis among COVID-19 intubated patients: a prospective study. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* (2020) doi:10.1093/cid/ciaa1065.
235. Patel, A. *et al.* Multicenter Epidemiologic Study of Coronavirus Disease–Associated Mucormycosis, India. *Emerg. Infect. Dis.* **27**, 2349–2359 (2021).
236. Pal, R. *et al.* COVID-19-associated mucormycosis: An updated systematic review of literature. *Mycoses* **64**, 1452–1459 (2021).
237. Nasir, N., Farooqi, J., Mahmood, S. F. & Jabeen, K. COVID-19 associated mucormycosis: a life-threatening complication in patients admitted with severe to critical COVID-19 from Pakistan. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 1704–1707 (2021).
238. RECOVERY Collaborative Group *et al.* Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**, 693–704 (2021).
239. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet Lond. Engl.* **397**, 1637–1645 (2021).
240. Kuri-Cervantes, L. *et al.* Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.* **5**, eabd7114 (2020).
241. Meyer, A. *et al.* HSV-1 reactivation is associated with an increased risk of mortality and pneumonia in critically ill COVID-19 patients. *Crit. Care Lond. Engl.* **25**, 417 (2021).
242. Saade, A., Moratelli, G., Azoulay, E. & Darmon, M. Herpesvirus reactivation during severe COVID-19 and high rate of immune defect. *Infect. Dis. Now* **51**, 676–679 (2021).
243. Niitsu, T. *et al.* Cytomegalovirus infection in critically ill patients with COVID-19. *J. Infect.* **83**, 496–522 (2021).

Annexes

RESEARCH LETTER

Open Access

Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients

Pierre Le Balc'h^{1,2}, Kieran Pinceaux^{1,2}, Charlotte Pronier³, Philippe Seguin⁴, Jean-Marc Tadié^{1,2} and Florian Reizine^{1,2*}

Dear Editor,

The SARS-CoV-2 infection can lead to severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) with prolonged mechanical ventilation (MV). Patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) associated ARDS usually met the diagnosis criteria for sepsis-associated immunosuppression as acquired infections, primarily bacterial and fungal co-infections [1], are frequently encountered. Such secondary infections are associated with late mortality. *Herpesviridae* reactivation is common in non-immunocompromised patients with prolonged MV and could be responsible for increased mortality and longer duration of MV in ICU [2, 3]. Although the diagnosis of *Herpesviridae* pulmonary infection is challenging and not consensual in critically ill patients, therapeutic strategies are available to reduce morbidity and mortality [4]. As viral co-infections in these patients remain poorly investigated, we aimed to describe *Herpesviridae* pulmonary reactivations in patients with COVID-19 ARDS.

Methods

We reviewed all virology results for patients admitted to Rennes University Hospital (Rennes, France) for COVID-19 ARDS between March 3, 2020, and April 15, 2020. SARS-CoV-2 infection was confirmed by polymerase chain reaction (PCR). Patients mechanically ventilated longer than 7 days and who had negative PCR for herpes simplex virus (HSV) and cytomegalovirus (CMV) were included in the analysis. Herpes simplex virus and

cytomegalovirus replication were measured by quantitative real-time PCR on tracheal aspirates twice a week for each patient. *Herpesviridae* reactivation was defined as two consecutive positive HSV or CMV PCR on tracheal aspirates. The Mann-Whitney rank sum test was used to compare non-parametric continuous variables, and qualitative data were compared using Fisher's exact test. Statistical significance was defined as $P < .05$. PRISM version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to perform statistical analyses.

Results

A total of 38 patients were included. Table 1 shows the demographic, clinical, and biological characteristics of the included patients. The mean age was 59 years (interquartile range (IQR), 54–71), and 27 (71%) were male. Of these 38 patients, 18 (47%) presented at least one viral pulmonary reactivation. Nine patients had HSV reactivation alone, 2 presented CMV reactivation alone, and 7 had co-reactivation. *Herpesviridae* infection was diagnosed at a median of 9 days (IQR, 5–14). The median number of positive samples was 3 (IQR, 2–5).

Patients with *Herpesviridae* reactivation had significantly longer duration of MV compared with patients without *Herpesviridae* reactivation. Table 2 shows outcomes of patients according to *Herpesviridae* reactivation status.

Discussion

Our findings suggest that *Herpesviridae* reactivations are frequent in patients with COVID-19 ARDS, with higher rates than those described in previous studies performed in critically ill patients [2, 3]. This result was expected since severe forms of COVID-19 ARDS are associated

* Correspondence: florian.reizine@chu-rennes.fr¹Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, CHU Rennes, F-35033 Rennes, France²Faculté de Médecine, Biosit, Université Rennes 1, F-35043 Rennes, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2020 **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/>. 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 in a credit line to the data.

Table 1 ARDS COVID patient's characteristics at ICU admission

	All patients (n = 38)	No <i>Herpesviridae</i> reactivation (n = 20)	<i>Herpesviridae</i> reactivation (n = 18)	P value
Demographic characteristics				
Age, years	59 (54–71)	57 (48–69)	64 (55–72)	0.07
Sex				
Men	27 (71)	15 (75)	12 (67)	> 0.99
Women	11 (29)	5 (25)	6 (33)	
BMI	24 (24–31)	27 (23–27)	26.9 (24–29)	0.78
Current smoking	2 (5)	1 (5)	1 (5)	0.94
Coexisting conditions				
Any	19 (50)	10 (50)	9 (50)	> 0.99
Diabetes	15 (40.5)	7 (35)	8 (44)	0.55
Cancer	3 (8)	2 (10)	1 (5)	> 0.99
Clinical and biological baseline characteristics				
White blood cell count (10 ⁹ /L)	10.1 (3.4–13)	7.8 (6–10.4)	11.2 (7.3–13.2)	0.07
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	0.74 (0.59–1.04)	0.79 (0.53–1.06)	0.83 (0.7–1.23)	0.29
Ratio of PaO ₂ to FiO ₂	106 (95–170)	90 (69–142)	116 (90–147)	0.15
SAPS II score on day 1	42 (31–58)	39 (29–61)	42 (33–55)	0.65
SOFA score on day 1	3 (2–7)	7 (2–9)	3 (2–7)	0.81

Data are presented as median (IQR: interquartiles), n (%). P values comparing the *Herpesviridae* reactivation and no *Herpesviridae* reactivation groups are tested by the Mann-Whitney (continuous variables) or Fisher's exact test (categorical variables)

Abbreviations: BMI body mass index, ICU intensive care unit, PaO₂ arterial oxygen tension, FiO₂ fraction of inspired oxygen, SAPS II Simplified Acute Physiology Score, SOFA Sequential Organ Failure Assessment

Table 2 Treatments and clinical course of COVID-19 patients according to *Herpesviridae* status

	All patients (n = 38)	No <i>Herpesviridae</i> reactivation (n = 20)	<i>Herpesviridae</i> reactivation (n = 18)	P value
Antibiotics	38 (100)	20 (100)	18 (100)	0.99
Antiviral	32 (84)	16 (80)	16 (89)	0.66
Steroids	12 (32)	4 (20)	8 (44)	0.16
ECMO	3 (8)	1 (5)	2 (11)	0.49
Duration of NMB infusion	6 (3–11)	5 (3–8)	6 (3–11)	0.73
Renal replacement therapy	9 (24)	5 (25)	4 (22)	0.99
Prone positioning ventilation	21 (55)	11 (52)	10 (56)	0.24
Duration of mechanical ventilation	18 (13–25)	9 (6–14)	23 (18–39)	0.0001
Ventilator-free days at day 28	8 (0–15)	14 (7–20)	2 (0–3)	0.0008
Ratio of PaO ₂ to FiO ₂ on day 7	193 (135–248)	212 (160–260)	178 (135–195)	0.04
Ratio of PaO ₂ to FiO ₂ on day 14	216 (174–308)	280 (222–401)	186 (114–233)	0.01
SOFA score on day 7	7 (5–11)	7 (5–10)	10 (6–11)	0.19
SOFA score on day 14	7 (2–10)	3 (1–10)	7 (2–10)	0.39
Bacterial VAP	9 (24)	3 (15)	6 (33)	0.18
ICU length of stay	23 (16–34)	16 (12–24)	29 (24–47)	0.0001
Death in ICU	4 (10.5)	2 (10)	2 (11)	0.99

Data are presented as median (IQR: interquartiles), n (%). P values comparing the *Herpesviridae* reactivation and no *Herpesviridae* reactivation groups are tested by the Mann-Whitney (continuous variables) or Fisher's exact test (categorical variables)

Abbreviations: ECMO extracorporeal membrane oxygenation, NMB neuromuscular blockade, PaO₂ arterial oxygen tension, FiO₂ fraction of inspired oxygen, SOFA Sequential Organ Failure Assessment, VAP ventilator-associated pneumonia, ICU intensive care unit

with biological and clinical markers of acquired immunosuppression such as lymphopenia [1]. This state of immunodeficiency probably plays a role in the occurrence of viral reactivations.

Among the most frequent risk factors for CMV and HSV reactivation in the ICU patients, sepsis and prolonged MV have been described in several studies [5, 6]. COVID-19 patients develop typical clinical and biological manifestations of septic shock [1]. There is no clear evidence that *Herpesviridae* reactivations induce difficulties to wean patients from MV nor increase the length of stay in COVID-19 patients, and our sample size did not allow us to perform a multivariate analysis. Larger studies are needed to explore such association. However, previous observational studies [5, 6] showed that *Herpesviridae* detection in the lower respiratory tract is associated with poorer outcomes.

Finally, our results suggest that SARS-CoV-2 infection could be a risk factor for *Herpesviridae* reactivation. Rapid identification of these co-infections seems warranted as it may impact the prognosis of infected patients. However, the direct consequences and the usefulness of antiviral treatments for these *Herpesviridae* infections remain factors that deserve to be investigated.

Acknowledgements

None

Authors' contributions

PLB, KP, PS, JMT, and FR took care of the patients, performed the literature review, and wrote the first draft of the article. CP performed the diagnostic tests and raised the critical comments on the article. The authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the CFTR² (Covid Fast Track Research Rennes) institutional grant from Rennes University Hospital.

Availability of data and materials

The datasets from this study are available from the corresponding author on request.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by Rennes University Hospital's review board (no. 16-117).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors report no conflict of interest related to this work.

Author details

¹Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, CHU Rennes, F-35033 Rennes, France. ²Faculté de Médecine, Biosit, Université Rennes 1, F-35043 Rennes, France. ³Service de Virologie, CHU Rennes, F-35033 Rennes, France. ⁴Service de Réanimation Chirurgicale, CHU Rennes, F-35033 Rennes, France.

Received: 14 July 2020 Accepted: 12 August 2020

Published online: 28 August 2020

References

- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507–13.
- Luyt C-E, Combes A, Deback C, Aubriot-Lorton M-H, Nieszowska A, Trouillet J-L, et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(9):935–42.
- Chiche L, Forel J-M, Roch A, Guervilly C, Pauly V, Allardet-Servent J, et al. Active cytomegalovirus infection is common in mechanically ventilated medical intensive care unit patients*. *Crit Care Med*. 2009;37(6):1850.
- Schuieler L, Gebhard M, Ruf H-G, Jaschinski U, Berghaus TM, Wittmann M, et al. Impact of acyclovir use on survival of patients with ventilator-associated pneumonia and high load herpes simplex virus replication. *Crit Care*. 2020;24(1):12.
- Coisel Y, Bousbia S, Forel J-M, Hraiech S, Lascola B, Roch A, et al. Cytomegalovirus and herpes simplex virus effect on the prognosis of mechanically ventilated patients suspected to have ventilator-associated pneumonia. *PLoS One*. 2012;7(12) [cited 2020 Jun 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3517464/>.
- Al-Omari A, Aljamaan F, Alhazzani W, Salih S, Arabi Y. Cytomegalovirus infection in immunocompetent critically ill adults: literature review. *Ann Intensive Care*. 2016;6 [cited 2020 Jun 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5095093/>.

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



Article

Influenza- and COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis: Are the Pictures Different?

Florian Reizine ^{1,*}, Kieran Pinceaux ¹, Mathieu Lederlin ², Brice Autier ^{3,4}, Hélène Guegan ^{3,4}, Arnaud Gacouin ¹, David Luque-Paz ¹, Christelle Boggione-Kerrien ⁵, Astrid Bacle ^{4,6}, Brendan Le Daré ⁶, Yoann Launey ⁷, Mathieu Lesouhaitier ¹, Benoit Painvin ¹, Christophe Camus ¹, Alexandre Mansour ¹, Florence Robert-Gangneux ^{3,4}, Sorya Belaz ³, Yves Le Tulzo ¹, Jean-Marc Tadié ¹, Adel Maamar ¹ and Jean-Pierre Gangneux ^{3,4,*}

- ¹ CHU Rennes, Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, F-35033 Rennes, France; kieran.pinceaux@chu-rennes.fr (K.P.); arnaud.gacouin@chu-rennes.fr (A.G.); david.luque-paz@chu-rennes.fr (D.L.-P.); mathieu.lesouhaitier@chu-rennes.fr (M.L.); benoit.painvin@chu-rennes.fr (B.P.); christophe.camus@chu-rennes.fr (C.C.); alexandre.mansour@chu-rennes.fr (A.M.); yves.le.tulzo@chu-rennes.fr (Y.L.T.); jeanmarc.tadie@chu-rennes.fr (J.-M.T.); adel.maamar@chu-rennes.fr (A.M.)
- ² CHU Rennes, Service d'Imagerie Médicale, F-35033 Rennes, France; mathieu.lederlin@chu-rennes.fr
- ³ CHU Rennes, Service de Parasitologie-Mycologie, F-35033 Rennes, France; brice.autier@chu-rennes.fr (B.A.); helene.guegan@chu-rennes.fr (H.G.); florence.robert-gangneux@univ-rennes1.fr (F.R.-G.); sorya.belaz@chu-rennes.fr (S.B.)
- ⁴ Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail)—UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France; astrid.bacle@univ-rennes1.fr
- ⁵ CHU Rennes, Service de Pharmacologie, F-35033 Rennes, France; christelle.boggione-kerrien@chu-rennes.fr
- ⁶ CHU Rennes, Service de Pharmacie, F-35033 Rennes, France; brendan.le.dare@chu-rennes.fr
- ⁷ CHU Rennes, Service de Réanimation Chirurgicale, F-35033 Rennes, France; yoann.launey@chu-rennes.fr
- * Correspondence: florian.reizine@chu-rennes.fr (F.R.); jean-pierre.gangneux@univ-rennes1.fr (J.-P.G.)



Citation: Reizine, F.; Pinceaux, K.; Lederlin, M.; Autier, B.; Guegan, H.; Gacouin, A.; Luque-Paz, D.; Boggione-Kerrien, C.; Bacle, A.; Le Daré, B.; et al. Influenza- and COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis: Are the Pictures Different? *J. Fungi* **2021**, *7*, 388. <https://doi.org/10.3390/jof7050388>

Academic Editor: Katrien Lagrou

Received: 14 April 2021

Accepted: 11 May 2021

Published: 15 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in intensive care unit patients is a major concern. Influenza-associated acute respiratory distress syndrome (ARDS) and severe COVID-19 patients are both at risk of developing invasive fungal diseases. We used the new international definitions of influenza-associated pulmonary aspergillosis (IAPA) and COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA) to compare the demographic, clinical, biological, and radiological aspects of IAPA and CAPA in a monocentric retrospective study. A total of 120 patients were included, 71 with influenza and 49 with COVID-19-associated ARDS. Among them, 27 fulfilled the newly published criteria of IPA: 17/71 IAPA (23.9%) and 10/49 CAPA (20.4%). Kaplan–Meier curves showed significantly higher 90-day mortality for IPA patients overall ($p = 0.032$), whereas mortality did not differ between CAPA and IAPA patients. Radiological findings showed differences between IAPA and CAPA, with a higher proportion of features suggestive of IPA during IAPA. Lastly, a wide proportion of IPA patients had low plasma voriconazole concentrations with a higher delay to reach concentrations > 2 mg/L in CAPA vs. IAPA patients ($p = 0.045$). Severe COVID-19 and influenza patients appeared very similar in terms of prevalence of IPA and outcome. The dramatic consequences on the patients' prognosis emphasize the need for a better awareness in these particular populations.

Keywords: COVID-19; influenza; pulmonary aspergillosis; CAPA; IAPA; corticosteroids; acute respiratory distress syndrome; CT-scan; voriconazole; therapeutic drug monitoring

1. Introduction

Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) has been mainly described in patients with severe neutrophil dysfunction, especially those with prolonged neutropenia [1]. Increasing evidence shows that critically ill patients are at risk of IPA [2–4]. Risk factors for IPA development in these critical patients are heterogeneous. Lower respiratory tract impairment, prolonged mechanical ventilation, corticosteroid administration, or immunological

dysfunction are often involved [2]. The diversity of the patient backgrounds is reflected by their clinical and biological presentation and thus the criteria that should be used for case definition. Generic consensus definitions, such as those of the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group Education and Research Consortium (EORTC/MSGERC) or the AspICU [1,3,5], are sometimes not adapted to specific groups of patients [6].

Influenza-associated pulmonary aspergillosis (IAPA) is an emerging complication of influenza infection, often associated with *Aspergillus* tracheobronchitis [7], that markedly increases influenza-associated mortality [8]. Commonly recognized elements of IAPA include epithelial damage, NADPH-oxidase impairment and the modulation of immune function directly due to the virus, although the pathogenesis is still unclear [7]. IAPA cases exhibit atypical clinical features, which influence the results of diagnostic tests, such as broncho-alveolar lavage (BAL) and serum galactomannan (GM) or respiratory sample culture, as well as atypical radiological features [7]. This led to the recent proposition of new criteria for IAPA case definition in intensive care unit (ICU) patients [7]. Unlike IPA observed in immunocompromised patients, the radiological patterns of acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients are much more difficult to interpret and the particularities of IPA imaging in these situations have thus far been only poorly evaluated.

The background of patients suffering from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) also appears to be highly compatible with the occurrence of IPA [9]. ICU patients admitted for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and influenza virus infections share specific features, commonly described to increase the risk for ventilator associated pneumonia [10] and particularly fungal diseases including ARDS, possible corticosteroid administration, and systemic dysregulation of immune function [11]. The incidence of COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA) in ICU patients varies according to the major national cohorts from the United Kingdom (14.1%), Italy (27.7%), Germany (26.3%), the Netherlands (19.4%), and France (National MYCOVID clinical trial: 19.6% probable and possible CAPA) [12–16] and are similar to the rate of IAPA observed in ICU cohorts (19%) from Belgium and the Netherlands [8]. Nevertheless, the situation appears not to be strictly transposable between the two co-infections, as, for example, *Aspergillus* tracheobronchitis is not commonly described in CAPA and serum GM is much less frequently positive in CAPA than IAPA [1,7]. However, a more accurate comparison between CAPA and IAPA has until recently been difficult due to the absence of a clear CAPA case definition, as highlighted by some authors [15].

The recently published CAPA case definition [17] has made it possible to compare patients suffering from IAPA and CAPA. This will improve our epidemiological knowledge concerning CAPA, which is still incomplete, and represents the first step towards improving the management of the COVID-19-associated fungal risk [18,19]. In this monocentric retrospective study, we aimed to compare the demographic, clinical, radiological, and biological features and outcomes of IAPA and CAPA cases in ICU applying the recently proposed case definitions of CAPA.

2. Methods

2.1. Populations

All patients who were admitted from 20 September 2009 to 8 February 2020 to the ICUs of the Rennes University Hospital for influenza-associated ARDS and underwent a mycological analysis of BAL, tracheal aspirate, or sputum were included in the study as “influenza patients” ($n = 71$). All patients who were admitted to the same unit for COVID-19 from 3 March to 9 September 2020 were included as “COVID-19 patients” ($n = 49$). The COVID-19 patients were strictly monitored for fungal infections twice weekly based on tracheal aspirates, as detailed in a previous publication [20]. Influenza infection and COVID-19 were confirmed by RT-PCR of respiratory samples or nasopharyngeal swabs using the Influenza A/B r-geneTM (Argene[®], bioMérieux, Marcy-l’Etoile, France) and TaqPathTM COVID-19 (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Grafenstaden, France) assays.

ARDS was defined according to international guidelines [21]. Epidemiological and clinical data were collected during hospitalization. A blood count and biochemical check-up, including the measurement of creatinine levels, were performed at the beginning of the hospitalization for each patient. For statistical analysis, patients were classified following the AspICU [3], IAPA [7], and CAPA [17] criteria when specified. Data presented in tables and figures were extracted from each patient's medical records. The simplified acute physiology score (SAPS) II was assessed within 24 h following ICU admission and the Sepsis-Related Organ Failure Assessment (SOFA) score was calculated on days 1 and 5. This study conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and was approved by the institutional ethics board of Rennes University Hospital, France (N 20-56).

2.2. Detection of *Aspergillus* in Respiratory Samples by Culture and PCR

Fungal culture was performed from respiratory samples in Sabouraud-Chloramphenicol media, inoculated with 100 μ L of pellets, and incubated for seven days at 30 °C and 37 °C. *Aspergillus* isolates were identified at the genus level based on microscopic features. *Aspergillus* fungi were then identified at the species level by MALDI-ToF mass spectrometry after fungal colony extraction [22] using a MALDI Biotyper device (Bruker France, Marne-la-Vallée, France) and the Mass Spectrometry Identification (MSI) database for the identification of fungi [23].

The molecular detection of *Aspergillus* was also performed on respiratory samples after DNA extraction. Briefly, 200 μ L of a BAL pellet or other liquefied respiratory samples were first incubated overnight at 56 °C with proteinase K (Qiagen France, Les Ulis, France). DNA was then extracted using the manual QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) or the automated EZ1 Advanced XL system (Qiagen) using the EZ1 DSP Virus Kit (Qiagen). *Aspergillus* qPCR assays were performed as previously described, targeting either an *Aspergillus* mitochondrial gene or an *Aspergillus* 28S rDNA region [24], depending on the period of inclusion.

2.3. Detection of *Aspergillus* Galactomannan (GM) in Blood and Respiratory Samples

GM measurement was performed in serum with an index cutoff > 0.5 and in BAL with an index cutoff ≥ 1 using the Platelia GM *Aspergillus* assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) following the manufacturer's recommendations. GM detection in non-bronchoscopic lavage respiratory samples was performed using the sōna *Aspergillus* lateral flow assay (LFA) (IMMY diagnostics, OK, USA), following the manufacturer's recommendations, due to the biological hazard for laboratory workers. Quantitative results were obtained by reading the LFA with the sōna cube reader (IMMY diagnostics).

2.4. Imaging

Chest computed tomography (CT) scans of patients who developed IPA were analyzed by a senior radiologist who was blinded to the IAPA or CAPA status. The following items were categorized as absent or present as generally reported in the literature: diffuse reticular or alveolar opacities, wedge-shaped segmental or lobar consolidation, well-circumscribed nodules, halo signs, cavitation, air crescent signs, tree in bud, bronchial wall thickening, and pleural effusion [1,3,7].

2.5. Therapeutic Drug Monitoring

Among patients treated with voriconazole, therapeutic drug monitoring was performed after the initiation of this treatment. A plasmatic voriconazole trough concentration (VTC) target between 2 and 6 mg/L was recommended as a voriconazole therapeutic range in ICU IPA patients [25].

Trough concentrations (=C_{min}), defined as concentrations measured 12 ± 2 h after voriconazole administration, were measured from day 3 after the beginning of the treatment, after achievement of steady-state. Blood samples were centrifuged at $3200 \times g$ for 10 min, and then stored at -20 °C prior to being assayed. Voriconazole plasma concentra-

tions were determined using a validated liquid chromatography tandem mass spectrometry assay. The linearity range of the assay extends from 0.1 to 12 mg/L.

2.6. Statistical Analysis

Demographic and clinical characteristics of patients are presented as numbers and percentages for categorical variables and medians and interquartile ranges (IQR, 25–75%) for continuous variables. The Mann–Whitney U test was used for quantitative data and qualitative data were compared using the Chi-square or Fisher test, as appropriate. Survival curves were constructed until day 90 from the diagnosis of ARDS using the Kaplan–Meier method and were compared using the log rank test. Two-sided tests were performed and reached statistical significance when the p -value was <0.05 .

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and R Statistical Software 3.5.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3. Results

Overall, 120 patients were included in the study, 71 admitted for severe influenza and 49 for severe COVID-19. Among them, 27 (22.5%) presented with COVID-19- (CAPA) and Influenza- (IAPA) associated pulmonary aspergillosis. Among the 10/49 (20.4%) CAPA patients, four were probable CAPA and six possible CAPA according to the most recent consensual definitions by Koehler et al. [17]. Among the 17/71 (23.9%) IAPA patients, 13 fulfilled the definitions by Verweij et al. [7] and four the definitions by Blot et al. [3]. A comparative analysis of these two groups of IAPA patients showed no significant differences in terms of background, severity, or outcome. Thus, we considered all 17 patients to constitute the same IAPA group during this study. The IAPA diagnosis was based on at least one positive GM result for the serum ($n = 7/17$, 41.1%) and/or BAL ($n = 10/17$ patients, 58.8%) and/or a fungal culture of *A. fumigatus* from respiratory samples ($n = 15/17$, 88.2%). The CAPA diagnosis was based on at least one positive GM result for serum ($n = 3/10$, 30%) and/or an *A. fumigatus*-positive culture from a non-bronchoscopic lavage ($n = 9/10$ patients, 90%) and/or combined positivity of GM and *A. fumigatus* PCR in non-bronchoscopic lavage ($n = 1/10$, 10%). Mycological arguments that allowed the IPA classification are presented for each patient in Table S1.

Demographic and admission characteristics of the patients according to their aspergillosis status are summarized in Table 1. The median age was 59 years and 80 (66%) of 120 patients were men. There were no significant differences in demographic or admission characteristics between patients with and without IPA. CAPA patients were significantly older than IAPA patients (mean ages 72 and 58 years, $p = 0.036$). The proportion of immunosuppressed patients was numerically higher among patients with IPA (37%, 10/27) than those without (20%, 19/93), but the difference did not reach statistical significance ($p = 0.076$). Similarly, the frequency of immunosuppressed patients was lower among CAPA patients (20%) than IAPA patients (47.1%) without reaching statistical difference. Among recognized risk factors for IPA, solid cancers and hematological malignancies were observed for 25.9% of IPA patients and 12.9% of patients without IPA ($p = 0.13$). A summary of reported cases is presented in Table S2. The frequency of patients with neoplasia was lower in CAPA (10%) than IAPA patients (35.3%), without reaching statistical difference.

The biological data at ICU admission are summarized in Table 1 and show that the CAPA patients were globally less severely ill than the IAPA patients. The SOFA score on day 1 was significantly lower for CAPA than IAPA patients ($p = 0.012$). Survival analysis at day 90 showed higher mortality among all IPA patients ($p = 0.042$), whereas mortality did not differ between those with CAPA and IAPA (Figure 1).

Table 1. Characteristics of patients according to aspergillosis status.

	All Patients (n = 120)	All Aspergillosis Patients (n = 27)	Non Aspergillosis Patients (n = 93)	p Value	IAPA (n = 17)	CAPA (n = 10)	p Value
Baseline characteristics							
Age (years)	59 (52–67)	60 (52–69)	59 (52–67)	0.54	58 (52–63)	72 (57–77)	0.036
Male sex	80 (66.4%)	17 (63%)	63 (67.7%)	0.21	11 (64.7%)	6 (60.0%)	>0.99
Current smoking	31 (26%)	10 (37%)	21 (22.6%)	0.13	9 (52.9%)	1 (10.0%)	0.12
Obesity	20 (16.6%)	4 (15.4%)	30 (32.3%)	0.09	3 (17.6%)	1 (10.0%)	>0.99
Diabetes	33 (27.5%)	4 (14.8%)	29 (31.2%)	0.14	2 (11.8%)	2 (20.0%)	0.61
Alcoholism	20 (16.6%)	6 (22.2%)	14 (15.1%)	0.39	5 (29.4%)	1 (10.0%)	0.36
Immunodepression (including neoplasia)	29 (24.1%)	10 (37%)	19 (20.4%)	0.12	8 (47.1%)	2 (20.0%)	0.23
Neoplasia	19 (15.8%)	7 (25.9%)	12 (12.9%)	0.13	6 (35.3%)	1 (10.0%)	0.2
- Solid cancer	3 (2.5%)	1 (3.7%)	2 (2.2%)	0.53	1 (5.9%)	0 (0.0%)	>0.99
- HM	16 (13.3%)	6 (22.2%)	10 (10.7%)	0.19	5 (29.4%)	1 (10.0%)	0.36
Chronic obstructive pulmonary disease	17 (14.2%)	6 (22.2%)	11 (11.8%)	0.17	6 (35.3%)	0 (0.0%)	0.057
Chronic kidney disease	10 (8.3%)	2 (7.4%)	8 (8.6%)	>0.99	1 (5.9%)	1 (10.0%)	>0.99
Cirrhosis	8 (6.7%)	4 (14.8%)	4 (4.3%)	0.07	4 (23.5%)	0 (0.0%)	0.26
ARDS etiology							
- Influenza	71 (59.2%)	17 (63%)	54 (58.1%)	0.65	NA	NA	NA
- COVID-19	49 (40.8%)	10 (37%)	39 (41.9%)				
Clinical and biological admission ICU data							
Neutrophil (10 ⁹ /L)	6.9 (3.9–11.4)	8.2 (3.8–13.2)	6.9 (4.1–11)	0.67	8.0 (3.6–17.7)	8.5 (4.1–11.0)	0.72
Lymphocyte (10 ⁹ /L)	0.56 (0.32–0.87)	0.54 (0.36–0.72)	0.59 (0.32–0.93)	0.44	0.38 (0.29–0.55)	0.83 (0.72–0.92)	<0.0001
Ratio of PaO ₂ to FiO ₂ on day 1	98 (67–147)	98 (74–143)	105 (67–148)	0.96	86 (69–98)	143 (109–154)	0.01
SAPS II score on day 1	44 (35–61)	48 (36–64)	43 (34–60)	0.22	58 (42–64)	40 (34–68)	0.48
SOFA score on day 1	8 (5–10)	9 (5–12)	7 (4–10)	0.19	10 (7–13)	5 (2–8)	0.012
Clinical course data							
Duration of mechanical ventilation (days)	18 (11–27)	23 (17–40)	17 (9–25)	0.038	23 (16–49)	23 (19–30)	0.56
ECMO	45 (37.5%)	13 (48.1%)	32 (34.4%)	0.19	12 (70.6%)	1 (10.0%)	0.004
SOFA score on day 5	8 (6–12)	11 (7–14)	7 (5–11)	0.003	10 (6–14)	12 (8–13)	0.83
RRT use	37 (30.8%)	13 (48.1%)	24 (25.8%)	0.027	8 (47.1%)	5 (50.0%)	>0.99
Corticosteroids use	55 (45.8%)	19 (70.4%)	36 (38.7%)	0.004	12 (70.6%)	7 (70.0%)	>0.99
- before day 7	45 (81.8%)	16 (84.2%)	29 (80.6%)	0.008	12 (100%)	4 (57.1%)	0.22
- after day 7	10 (18.2%)	3 (15.8%)	7 (19.4%)	0.14	0 (0.0%)	3 (42.9%)	0.04
ICU length of stay (days)	22 (12–33)	25 (19–48)	19 (12–30)	0.044	29 (12–48)	24 (22–29)	0.97
Death in the ICU	28 (23.3%)	9 (33.3%)	19 (20.4%)	0.16	6 (35.3%)	3 (30.0%)	>0.99
90-day survival	89 (74.2%)	16 (59.3%)	74 (79.6%)	0.032	9 (52.9%)	7 (70.0%)	0.44
Death in hospital	31 (25.8%)	12 (44.4%)	19 (20.4%)	0.012	8 (47.1%)	4 (40.0%)	0.45

Data are presented as medians (IQR: interquartiles) or n (%). p values comparing the invasive aspergillosis vs. no aspergillosis groups and IAPA vs. CAPA were calculated using Mann–Whitney (continuous variables) and Fisher or Chi2 tests when appropriate (categorical variables). AKI: acute kidney injury, PaO₂: arterial oxygen partial pressure, SAPS II: Simplified Acute Physiology Score I, SOFA: Sequential Organ Failure Assessment, HM: hematological malignancies, COVID-19: Coronavirus Disease 2019, ECMO: extracorporeal membrane oxygenation; PaO₂: arterial oxygen tension; FiO₂: fraction of inspired oxygen; RRT: renal replacement therapy; ICU: intensive care unit; - among neoplasia.

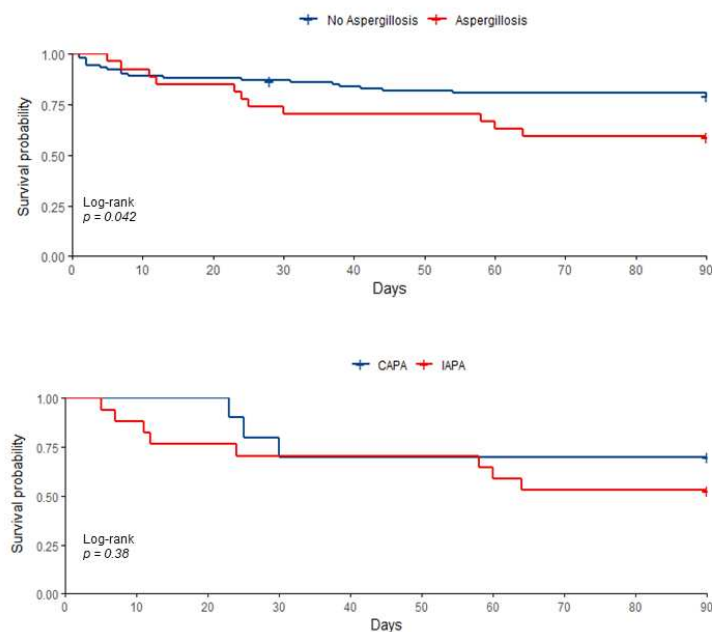


Figure 1. Cumulative 90-day mortality from admission to the intensive care unit in the whole population (**Top**) and among CAPA and IAPA patients (**Below**).

In this cohort, the duration of mechanical ventilation was higher for patients with IPA (23 days [IQR 17–40]) than those without (17 days [IQR 9–25], $p = 0.038$) (Table 1). Renal replacement therapy was more frequent for IPA patients ($p = 0.027$) and supportive therapy by extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) was less frequent for CAPA than IAPA patients ($p = 0.004$). Patients who developed IPA were more frequently treated by corticosteroids (70.4% vs. 38.7%, $p = 0.004$) and the frequency of such treatment was similar for the CAPA and IAPA groups. The median ICU length of stay was longer for IPA patients (25 days [IQR 19–48] vs. 19 days [IQR 12–30], $p = 0.04$). Finally, survival at 90 days after ICU admission was 59.3% for those with IPA and 79.6% for those without an *Aspergillus* infection ($p = 0.032$). Assessment of clinical and laboratory features at IPA diagnosis is presented in Table 2. Of note, a trend pointing towards a longer median interval between ICU admission and IPA diagnosis in CAPA (6 days [IQR 3–13]) was observed compared to IAPA patients (3 days [IQR 2–5]; $p = 0.14$). Among patients treated by voriconazole, CAPA patients experienced a trend towards a longer time to reach therapeutic range (VTC target: 2–6 mg/L) (7 days [IQR 6–32] vs. 4 days [2–8], $p = 0.096$). Therapeutic drug monitoring of these patients showed a higher proportion of CAPA patients that obtained a delayed voriconazole therapeutic range since at day 5 after the initiation of voriconazole, 83.3% of CAPA patients and 33.3% of IAPA patients remained with a voriconazole dosage under 2 mg/L ($p = 0.045$). Similarly VTC appeared to be lower in CAPA patients (2.2 mg/L [IQR 1.1–4.4] vs. 3.9 mg/L [IQR 2–5.7]; $p = 0.01$).

Table 2. Clinical and biological characteristics at CAPA and IAPA diagnosis.

	All Aspergillo- sis Patients (n = 27)	IAPA (n = 17)	CAPA (n = 10)	p Value
Temperature (°C)	38.2 (38.0–39.0)	38.0 (37.8–38.8)	38.9 (38.1–39.0)	0.19
Systolic pressure (mmHg)	92 (81–102)	92 (85–102)	90 (78–101)	0.95
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	9.6 (4.5–16.5)	13.2 (5.5–19.5)	7.6 (4.0–10.3)	0.18
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	0.72 (0.51–1.03)	0.80 (0.50–1.22)	0.72 (0.55–0.80)	0.56
Ratio of PaO2 to FiO2	134 (102–179)	108 (86–165)	162 (147–208)	0.04
Septic shock	17 (63.0%)	12 (70.6%)	5 (50.0%)	0.41
Need for vasopressors	19 (70.4%)	12 (70.6%)	7 (70.0%)	>0.99
Delay between admission and aspergillo- sis onset (days)	4 (2–8)	3 (2–5)	6 (3–13)	0.14
Mechanical ventilation duration after aspergillo- sis onset (days)	20 (9–36)	22 (8–46)	17 (11–23)	0.64
Antifungal therapy	25 (92.6%)	17 (100%)	8 (80%)	0.13
Time to VCZ therapeutic range (days) *	6 (4–9)	4 (2–8)	7 (6–32)	0.096
Delayed VCZ therapeutic range (>5 days) *	9/18 (50%)	4/12 (33.3%)	5/6 (83.3%)	0.045
VTC (mg/L) *	2.8 (1.5–5)	3.9 (2–5.7)	2.2 (1.1–4.4)	0.01
VTC min (mg/L) *	1.6 (0.5–3.8)	3.5 (1–5)	0.8 (0.2–0.8)	0.038
VTC max (mg/L) *	5.8 (4.5–7.2)	6.1 (5.4–7.6)	5.2 (3–7)	0.23
Antifungal treatment duration (days)	42 (14–42)	17 (14–47)	42 (37–42)	0.49

Data are presented as medians (IQR: interquartiles) or n (%). p values comparing IAPA vs. CAPA were calculated using Mann–Whitney (continuous variables) and Fisher or Chi2 tests when appropriate (categorical variables). IAPA: Influenza Associated Pulmonary Aspergillo-
sis; CAPA: COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillo-
sis; PaO2: arterial oxygen partial pressure; FiO2: Fraction of inspired Oxygen; VCZ: Voriconazole; VTC: Voriconazole Trough Concentration. * Among IPA patients, 19 were treated by voriconazole alone and 18 of them were performed a watchful therapeutic drug monitoring, two patients were treated by isavuconazole, two others by voriconazole which was switched for isavuconazole, one by voriconazole plus amphotericin B, and finally two patients did not receive any antifungal treatment. The data concerning TDM monitoring displayed in this table are based on the results of the 18 patients who only received voriconazole and for whom frequent monitoring could be performed.

Chest CT scans were performed for 24 of 27 patients between eight days before and 12 days after IPA diagnosis. Lung parenchyma abnormalities were present in all patients (Table 3). A lower proportion of well-circumscribed nodules, tree-in bud, and bronchial wall thickening was observed for CAPA than IAPA patients (0% vs. 42.9% [$p = 0.024$] for well-circumscribed nodules, 0% vs. 50% [$p = 0.014$] for tree in bud, and 10% vs. 57% [$p = 0.03$] for bronchial wall thickening). These different aspects are presented in Figure 2 and the comparison of CT-scan features of CAPA patients at admission and at diagnosis is presented in Table S3.

Table 3. CT-scan analysis of IAPA and CAPA patients.

	All Aspergillo- sis Patients (n = 24)	IAPA (n = 14)	CAPA (n = 10)	p Value
Delay between ICU admission and CT scan	10 (4–15)	9 (4–15)	10 (3–15)	0.99
Delay between IPA diagnosis and CT scan	5 (0–9)	4 (0–9)	7 (0–9)	0.75
Diffuse reticular or alveolar opacities	24 (100%)	14 (100%)	10 (100%)	0.99
Wedge-shaped segmental or lobar consolidation	17 (70.8%)	10 (71.4%)	7 (70.0%)	0.99
Well-circumscribed nodule(s)	6 (25.0%)	6 (42.9%)	0 (0.0%)	0.024
Halo sign	3 (12.5%)	2 (14.3%)	1 (10.0%)	0.68
Cavitation	5 (20.8%)	5 (35.7%)	0 (0.0%)	0.053
Air-crescent sign	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.99
Tree in bud	7 (29.2%)	7 (50.0%)	0 (0.0%)	0.019
Bronchial wall thickening	8 (33.3%)	8 (57.1%)	1 (10.0%)	0.03
Pleural effusion	9 (37.5%)	5 (35.7%)	4 (40.0%)	0.99

Data are presented as n (%). p values comparing influenza associated pulmonary aspergillo-
sis (IAPA) vs. COVID-19 associated pulmonary aspergillo-
sis (CAPA). IAPA and CAPA groups were tested using Fisher’s exact test (categorical variables). CT-scan: computerized-
tomography scanner.

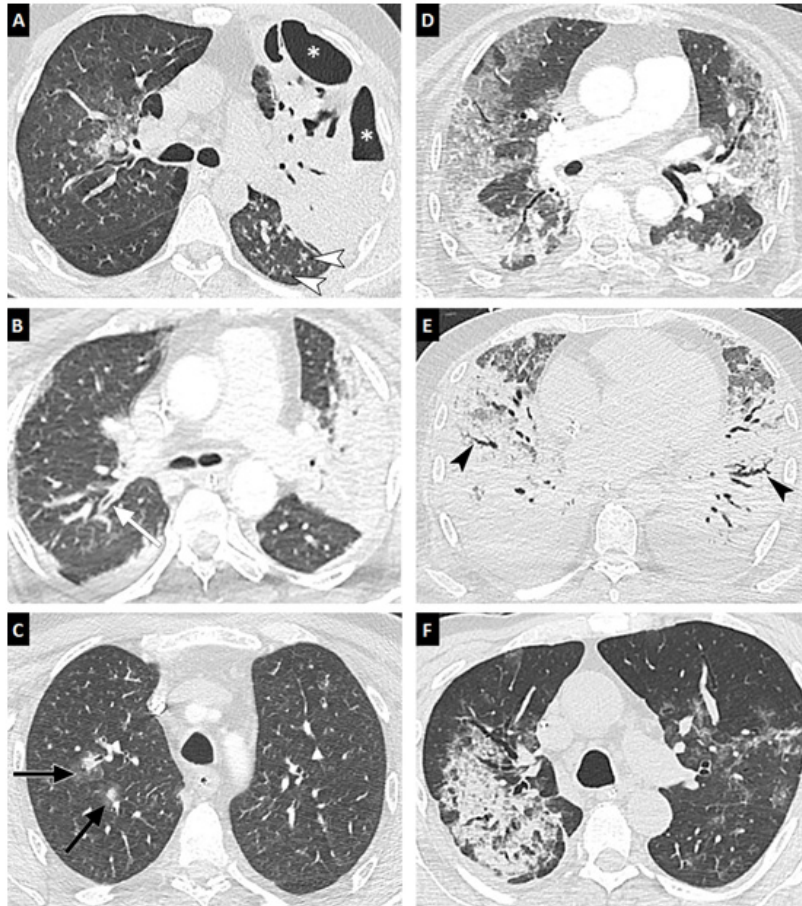


Figure 2. Chest CT-scan of LAPA and CAPA patients. Chest CT scans in the axial plane (lung window: W1600/L-500 HU) of three patients with LAPA (A–C) and three patients with CAPA (D–F). Typical CT findings in LAPA are unilateral or bilateral areas of consolidation with air bronchogram (A,B), cavity formation (asterisks), tree in bud (white arrowheads), bronchial wall thickening (white arrow), or occasionally nodules with halo signs (C, black arrows). Patients with CAPA may exhibit non-specific CT findings, such as bilateral areas of ground-glass opacity and/or crazy paving (D), extensive consolidations areas associated with peripheral traction bronchiectasis (E, black arrowheads), or, more rarely, unilateral consolidation areas (F). Despite not being very specific for a SARS COV2 infection, findings observed in (D,E) pictures can be seen frequently in severe COVID-19 patients.

Finally, a summary of similarities and differences between CAPA and IAPA are presented in Table 4.

Table 4. Summary of similarities and differences between CAPA and IAPA.

Similarities between CAPA and IAPA	Differences between CAPA and IAPA
<ul style="list-style-type: none"> • Prevalence of IPA between COVID-19 and influenza-associated ARDS • Background of patients • Similar clinical courses in ICU with a trend for a longer median interval between ICU admission and IPA diagnosis in CAPA • Higher mortality than for patients without IPA among both CAPA and IAPA patients 	<ul style="list-style-type: none"> • Higher proportion of older patients among CAPA patients • Lower day 1 SOFA score in CAPA patients • Higher ratio of PaO₂ to FiO₂ in CAPA patients • Lower proportion of ECMO among CAPA patients • Therapeutic drug monitoring of voriconazole more challenging for CAPA patients • Lower proportion of patients presenting radiological features suggestive of IPA among CAPA patients

4. Discussion

In this single-center study, 22.5% of patients admitted to the ICU for a severe viral infection, such as COVID-19 (20.4%) or Influenza pneumonia (23.9%), developed IPA. A similar prevalence of IPA in ICU patients was observed in the two major representative series of severe influenza (19.2% in a Dutch-Belgian multicenter study on 432 patients, [8]) and COVID-19 patients (19.6% probable and possible CAPA in a French multicenter prospective study with 509 patients included [16]). Secondary fungal infections may have had an impact on the prognosis for these patients, as the mortality rate, duration of mechanical ventilation, and ICU length of stay were associated with the occurrence of IPA. To date, only limited data are available on the comparison of IAPA and CAPA. In-hospital death occurred for 47.1% and 40% of patients with IAPA and CAPA, respectively, vs. 20.4% for patients without aspergillosis. Such a high mortality rate has already been observed for IAPA vs. non IAPA ICU patients (51% vs. 28%, respectively, [26]). Bartoletti et al., among others, have reported similar mortality rates of 44% for CAPA patients vs. 19% for non-CAPA patients during the COVID-19 pandemic [13]. Although the median age was significantly higher for CAPA than IAPA patients, other demographic data and characteristics of the patients at IPA diagnosis were comparable between the two populations. Among them, immunosuppression was not statistically significantly different, but 47.1% of IAPA patients were immunosuppressed vs. 20% of CAPA patients. Concerning biological data, lymphopenia, the PaO₂ to FiO₂ ratio on day 1, and the SOFA score on day 1 were less severe for the CAPA than IAPA patients.

IPA diagnosis in non-neutropenic ICU patients is challenging, as the clinical and radiological features of IPA are not specific and can be affected by underlying conditions. The radiological criteria of pulmonary mold diseases were recently revised in the consensus definitions for invasive fungal disease [1]. The authors proposed to add a new more sensitive item, defined as wedge-shaped lobar or segmental consolidation, to the classical CT criteria (solid nodule, halo sign, cavitation, air-crescent sign). These updated criteria were validated in a recent cohort analysis in which nodule and/or consolidation patterns were observed in more than 98% of IPA patients, irrespective of their neutrophil status [27]. Nodule and consolidation patterns were present, alone or together, in our study in 83% of cases (93% of IAPA and 70% of CAPA). Of note, although these updated criteria increase the sensitivity of CT for the detection of aspergillosis, they concurrently decrease its specificity, and there is currently no CT sign that is both sensitive and specific for aspergillosis. In the present study, although radiological findings were generally considered to not be suggestive of IPA during ARDS, a meticulous analysis showed several interesting differences between the images, with well-circumscribed nodules, tree in bud, and bronchial wall thickening, which were observed significantly more frequently in IAPA patients than CAPA patients. Otherwise, the timing of imaging may also affect the sensitivity of such tools regarding IPA diagnosis. It may be useful to perform new CT scans after the diagnosis of IPA in order to increase the sensitivity.

Because of these non-specific features, mycological testing is of great value for the screening of IPA in these patients. Compared to the AspICU classification, the main advance of the new consensual IAPA and CAPA definitions is to fine-tune criteria and

tools for respiratory samples. In the IAPA definition according to Verweij et al., positive tracheal aspirates and even positive sputum cultures are criteria for probable IAPA, depending on the clinical presentation [28], and pulmonary or cavitating infiltrates [7]. Concerning CAPA, PCR and GM detection in respiratory samples are now included in the definition by Koehler et al. and although positive BAL is a criterion for probable CAPA, non-bronchoscopic respiratory samples are criteria for possible CAPA. The severity and clinical outcome of IAPA and CAPA from this series relative to that of other ICU patients highlights the relevance of these new definitions.

These specific conditions suggest that IPA is likely to be underdiagnosed in ARDS populations [4], whereas recent evidence has suggested that critically ill patients, in particular both severe influenza and COVID-19 patients, are populations at risk of IPA. Several mechanisms that may facilitate fungal infection have been identified, such as sepsis-induced systemic immunosuppression due to severe influenza virus or SARS-CoV-2 infection [29]. Several recent studies reported profound lymphopenia in severe COVID-19 associated with the expansion of myeloid derived suppressor cells, which may promote the acquisition of secondary infections, as illustrated by the large proportion of COVID-19 patients that develop respiratory reactivation of Herpes virus [30]. On the other hand, alveolar damage, dysfunction of mucociliary clearance, and local immune disorders due to COVID-19 or severe influenza pneumonia may also be key mechanisms involved in fungal invasion [8]. Finally, recent therapeutic strategies have emerged worldwide during the first months of COVID-19 pandemic with the aim of reducing inpatient mortality, such as corticosteroids, new antiviral drugs, or biotherapies. The recent RECOVERY trial [31] has positioned corticosteroids as first-line therapeutic agents, with a demonstrated improvement of patient prognosis. Although such improvement with low-dose corticosteroids (i.e., 6 mg of dexamethasone per day for 10 days) should be highlighted, we observed a significant association between corticosteroid use and the occurrence of IPA. Cohort studies have already demonstrated that corticosteroids increase the risk of IPA in severe influenza patients [11], emphasizing the need for enhanced awareness of IPA in these patients. Drug-drug interactions also arise in this context. Dexamethasone was widely used in CAPA patients and induces CYP2C9, which could decrease the VTC [32]. Thus, therapeutic drug monitoring is a cornerstone for patient management, as we faced low concentrations of voriconazole in this series with a significant delay to reach the optimal therapeutic range in CAPA vs. IAPA patients. Since we faced difficulties reaching voriconazole therapeutic concentrations in CAPA patients, the use of alternative antifungal treatments such as isavuconazole or posaconazole could be envisaged in this specific population [33,34].

Our study had several limitations, including the sample size, which prevented multivariate analysis. Furthermore, during the first wave of the COVID-19 pandemic, bronchoscopic explorations were considered as a source of exposure to SARS-CoV-2 for physicians due to the risk of the aerosolization during this procedure. Thus, we performed such investigations less frequently in COVID-19 patients; this risk has been debunked in recent papers [35]. Hence, it was not always possible to identify bronchoscopic findings suggestive of *Aspergillus* tracheobronchitis, such as epithelial plaques, pseudomembranes, or ulcers.

The main strengths of this study included the standardized management of ARDS and mycological testing of all patient samples, allowing an exhaustive laboratory data set. Furthermore, this is one of the first studies to apply the new consensual criteria for both IAPA and CAPA, whereas questions have been recently raised concerning the relevance of other classifications in determining the true burden of disease [6].

In conclusion, ICU patients presenting with ARDS during COVID-19 are very similar to those with severe influenza pneumonia in terms of the prevalence of IPA and outcome. It is now possible to draw the archetype of such patients using the new clinical and biological case definitions of IAPA and CAPA. Radiological findings of IPA in both populations using the new criteria increased the sensitivity but still lack specificity. Nevertheless, they also showed interesting differences between IAPA and CAPA. IAPA typically occurs earlier

after ICU admission, in a more immunosuppressed and/or chronic respiratory disease background than CAPA, which is mainly favored by advanced age, irrespective of the medical background and with a lower rate of positivity of angioinvasion biomarkers. Finally, reaching voriconazole trough concentrations remains challenging in CAPA patients and emphasizes the importance of therapeutic drug monitoring. Future larger prospective studies may help in designing the most well-adapted personalized management to prevent IPA, which represents a high burden of death in severe COVID-19 and Influenza pneumonia.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7050388/s1>, Table S1: Mycological arguments for invasive pulmonary aspergillosis associated to influenza pneumonia (IAPA) and COVID-19 (CAPA) and classification, Table S2: Summary of reported cases of influenza associated pulmonary aspergillosis (IAPA) and COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA). Table S3: Comparison of CT-scan features of CAPA patients at admission and at diagnosis.

Author Contributions: Conceptualization and design was provided by F.R., K.P., M.L. (Mathieu Lederlin), A.G., J.-M.T., A.M. (Adel Maamar), and J.-P.G. Data analysis and interpretation were carried out by F.R., K.P., B.A., H.G., D.L.-P., C.B.-K., A.B., B.L.D., Y.L. and M.L. (Mathieu Lesouhaitier), B.P., C.C., A.M. (Adel Maamar), A.M. (Alexandre Mansour), F.R.-G., S.B. and J.-P.G.; CT-scans analysis were performed by M.L. (Mathieu Lederlin); Drafting and revision of the manuscript was carried out by F.R., M.L. (Mathieu Lederlin), Y.L., Y.L.T. and J.-P.G. with all authors providing critical feedback and edits to subsequent revisions. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and was approved by the institutional ethics board of Rennes University Hospital, France (N 20-56).

Informed Consent Statement: According to the institutional ethics board of Rennes University Hospital, France (N 20-56), a non-opposition statement was obtained for all patients included and, where applicable, relative or their legal representative, meaning that all had received written detailed information on the objectives of the study and were free to request withdrawal of their data at any time.

Data Availability Statement: Data are available in the Clinical data center of our hospital.

Acknowledgments: We thank the teams from the ICU and mycology laboratory of the Rennes Teaching Hospital.

Conflicts of Interest: J.-P.G. has received research grants and funding from MSD and Pfizer. The other authors report no conflict of interest related to this work.

References

1. Donnelly, J.P.; Chen, S.C.; Kauffman, C.A.; Steinbach, W.J.; Baddley, J.W.; Verweij, P.E.; Clancy, C.J.; Wingard, J.R.; Lockhart, S.R.; Groll, A.H.; et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 1367–1376. [[CrossRef](#)]
2. Taccone, F.S.; Van den Abeele, A.-M.; Bulpa, P.; Misset, B.; Meersseman, W.; Cardoso, T.; Paiva, J.-A.; Blasco-Navalpotro, M.; De Laere, E.; Dimopoulos, G.; et al. Epidemiology of Invasive Aspergillosis in Critically Ill Patients: Clinical Presentation, Underlying Conditions, and Outcomes. *Crit. Care* **2015**, *19*, 7. [[CrossRef](#)]
3. Blot, S.I.; Taccone, F.S.; Van den Abeele, A.-M.; Bulpa, P.; Meersseman, W.; Brusselaers, N.; Dimopoulos, G.; Paiva, J.A.; Misset, B.; Rello, J.; et al. A Clinical Algorithm to Diagnose Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *186*, 56–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Loughlin, L.; Hellyer, T.P.; White, P.L.; McAuley, D.F.; Conway Morris, A.; Posso, R.B.; Richardson, M.D.; Denning, D.W.; Simpson, A.J.; McMullan, R. Pulmonary Aspergillosis in Patients with Suspected Ventilator-Associated Pneumonia in UK ICUs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *202*, 1125–1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Maertens, J.; Theunissen, K.; Verbeken, E.; Lagrou, K.; Verhaegen, J.; Boogaerts, M.; Eldere, J.V. Prospective Clinical Evaluation of Lower Cut-Offs for Galactomannan Detection in Adult Neutropenic Cancer Patients and Haematological Stem Cell Transplant Recipients. *Br. J. Haematol.* **2004**, *126*, 852–860. [[CrossRef](#)]

6. Bassetti, M.; Giacobbe, D.R.; Grecchi, C.; Rebuffi, C.; Zuccaro, V.; Scudeller, L. FUNDICU investigators Performance of Existing Definitions and Tests for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Critically Ill, Adult Patients: A Systematic Review with Qualitative Evidence Synthesis. *J. Infect.* **2020**, *81*, 131–146. [[CrossRef](#)]
7. Verweij, P.E.; Rijnders, B.J.A.; Brüggemann, R.J.M.; Azoulay, E.; Bassetti, M.; Blot, S.; Calandra, T.; Clancy, C.J.; Cornely, O.A.; Chiller, T.; et al. Review of Influenza-Associated Pulmonary Aspergillosis in ICU Patients and Proposal for a Case Definition: An Expert Opinion. *Intensive Care Med.* **2020**, *46*, 1524–1535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Schauvlieghe, A.F.A.D.; Rijnders, B.J.A.; Philips, N.; Verwijs, R.; Vanderbeke, L.; Van Tienen, C.; Lagrou, K.; Verweij, P.E.; Van de Veerdonk, F.L.; Gommers, D.; et al. Invasive Aspergillosis in Patients Admitted to the Intensive Care Unit with Severe Influenza: A Retrospective Cohort Study. *Lancet Respir. Med.* **2018**, *6*, 782–792. [[CrossRef](#)]
9. Rutsaert, L.; Steinfurt, N.; Van Hunsel, T.; Bomans, P.; Naesens, R.; Mertes, H.; Dits, H.; Van Regenmortel, N. COVID-19-Associated Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Ann. Intensive Care* **2020**, *10*, 71. [[CrossRef](#)]
10. Maes, M.; Higginson, E.; Pereira-Dias, J.; Curran, M.D.; Parmar, S.; Khokhar, F.; Cuchet-Lourenço, D.; Lux, J.; Sharma-Hajela, S.; Ravenhill, B.; et al. Ventilator-Associated Pneumonia in Critically Ill Patients with COVID-19. *Crit. Care* **2021**, *25*, 25. [[CrossRef](#)]
11. Wauters, J.; Baar, I.; Meersseman, P.; Meersseman, W.; Dams, K.; De Paep, R.; Lagrou, K.; Wilmer, A.; Jorens, P.; Hermans, G. Invasive Pulmonary Aspergillosis Is a Frequent Complication of Critically Ill H1N1 Patients: A Retrospective Study. *Intensive Care Med.* **2012**, *38*, 1761–1768. [[CrossRef](#)]
12. White, P.L.; Dhillon, R.; Cordey, A.; Hughes, H.; Faggian, F.; Soni, S.; Pandey, M.; Whitaker, H.; May, A.; Morgan, M.; et al. A National Strategy to Diagnose COVID-19 Associated Invasive Fungal Disease in the ICU. *Clin. Infect. Dis.* **2020**. [[CrossRef](#)]
13. Bartoletti, M.; Pascale, R.; Ricca, M.; Rinaldi, M.; Maccaro, A.; Bussini, L.; Fornaro, G.; Tonetti, T.; Pizzilli, G.; Francalanci, E.; et al. Epidemiology of Invasive Pulmonary Aspergillosis among COVID-19 Intubated Patients: A Prospective Study. *Clin. Infect. Dis.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Koehler, P.; Cornely, O.A.; Böttiger, B.W.; Dusse, F.; Eichenauer, D.A.; Fuchs, F.; Hallek, M.; Jung, N.; Klein, F.; Persigehl, T.; et al. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis. *Mycoses* **2020**, *63*, 528–534. [[CrossRef](#)]
15. van Arkel, A.L.E.; Rijpstra, T.A.; Belderbos, H.N.A.; van Wijngaarden, P.; Verweij, P.E.; Bentvelsen, R.G. COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *202*, 132–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gangneux, J.P. Characterization of fungal infections in COVID-19 infected and mechanically ventilated patients in ICU: The MYCO-VID clinical trial. In Proceedings of the Data Presented during the Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Infectieuse (RICAI Congress), Paris, France, 14–15 December 2020.
17. Koehler, P.; Bassetti, M.; Chakrabarti, A.; Chen, S.C.A.; Colombo, A.L.; Hoenigl, M.; Klimko, N.; Lass-Flörl, C.; Oladele, R.O.; Vinh, D.C.; et al. Defining and Managing COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis: The 2020 ECMM/ISHAM Consensus Criteria for Research and Clinical Guidance. *Lancet Infect. Dis.* **2020**. [[CrossRef](#)]
18. Verweij, P.E.; Gangneux, J.-P.; Bassetti, M.; Brüggemann, R.J.M.; Cornely, O.A.; Koehler, P.; Lass-Flörl, C.; van de Veerdonk, F.L.; Chakrabarti, A.; Hoenigl, M.; et al. Diagnosing COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis. *Lancet Microbe* **2020**, *1*, e53–e55. [[CrossRef](#)]
19. Gangneux, J.-P.; Bournoux, M.-E.; Dannaoui, E.; Cornet, M.; Zahar, J.R. Invasive Fungal Diseases during COVID-19: We Should Be Prepared. *J. Mycol. Med.* **2020**, *30*, 100971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gangneux, J.-P.; Reizine, F.; Guegan, H.; Pincaux, K.; Le Balch, P.; Prat, E.; Pelletier, R.; Belaz, S.; Le Souhaitier, M.; Le Tulzo, Y.; et al. Is the COVID-19 Pandemic a Good Time to Include Aspergillus Molecular Detection to Categorize Aspergillosis in ICU Patients? A Monocentric Experience. *J. Fungi (Basel)* **2020**, *6*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. ARDS Definition Task Force; Ranieri, V.M.; Rubenfeld, G.D.; Thompson, B.T.; Ferguson, N.D.; Caldwell, E.; Fan, E.; Camporota, L.; Slutsky, A.S. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA* **2012**, *307*, 2526–2533. [[CrossRef](#)]
22. Cassagne, C.; Ranque, S.; Normand, A.-C.; Fourquet, P.; Thiebault, S.; Planard, C.; Hendrickx, M.; Piarroux, R. Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Normand, A.C.; Becker, P.; Gabriel, F.; Cassagne, C.; Accoceberry, I.; Gari-Toussaint, M.; Houssein, L.; De Geyter, D.; Pierard, D.; Surmont, I.; et al. Validation of a New Web Application for Identification of Fungi by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2661–2670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Guegan, H.; Robert-Gangneux, F.; Camus, C.; Belaz, S.; Marchand, T.; Baldeyrou, M.; Gangneux, J.-P. Improving the Diagnosis of Invasive Aspergillosis by the Detection of Aspergillus in Broncho-Alveolar Lavage Fluid: Comparison of Non-Culture-Based Assays. *J. Infect.* **2018**, *76*, 196–205. [[CrossRef](#)]
25. Abdul-Aziz, M.H.; Alffenaar, J.-W.C.; Bassetti, M.; Bracht, H.; Dimopoulos, G.; Marriott, D.; Neely, M.N.; Paiva, J.-A.; Pea, F.; Sjovall, F.; et al. Antimicrobial Therapeutic Drug Monitoring in Critically Ill Adult Patients: A Position Paper. *Intensive Care Med.* **2020**, *46*, 1127–1153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rijnders, B.J.A.; Schauvlieghe, A.F.A.D.; Wauters, J. Influenza-Associated Pulmonary Aspergillosis: A Local or Global Lethal Combination? *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 1764–1767. [[CrossRef](#)]
27. Herbrecht, R.; Guffroy, B.; Danion, F.; Venkatasamy, A.; Simand, C.; Ledoux, M.-P. Validation by Real-Life Data of the New Radiological Criteria of the Revised and Updated Consensus Definition for Invasive Fungal Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 2773–2774. [[CrossRef](#)]

28. Nyga, R.; Maizel, J.; Nseir, S.; Chouaki, T.; Milic, I.; Roger, P.-A.; Van Grunderbeeck, N.; Lemyze, M.; Totet, A.; Castelain, S.; et al. Invasive Tracheobronchial Aspergillosis in Critically Ill Patients with Severe Influenza. A Clinical Trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *202*, 708–716. [[CrossRef](#)]
29. Reizine, F.; Lesouhaitier, M.; Gregoire, M.; Pinceaux, K.; Gacouin, A.; Maamar, A.; Painvin, B.; Camus, C.; Le Tulzo, Y.; Tattevin, P.; et al. SARS-CoV-2-Induced ARDS Associates with MDSC Expansion, Lymphocyte Dysfunction, and Arginine Shortage. *J. Clin. Immunol.* **2021**, *41*, 515–525. [[CrossRef](#)]
30. Le Balc'h, P.; Pinceaux, K.; Pronier, C.; Seguin, P.; Tadié, J.-M.; Reizine, F. Herpes Simplex Virus and Cytomegalovirus Reactivations among Severe COVID-19 Patients. *Crit. Care* **2020**, *24*, 530. [[CrossRef](#)]
31. RECOVERY Collaborative Group; Horby, P.; Lim, W.S.; Emberson, J.R.; Mafham, M.; Bell, J.L.; Linsell, L.; Staplin, N.; Brightling, C.; Ustianowski, A.; et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 693–704. [[CrossRef](#)]
32. Imataki, O.; Yamaguchi, K.; Uemura, M.; Fukuoka, N. Voriconazole Concentration Is Inversely Correlated with Corticosteroid Usage in Immunocompromised Patients. *Transpl. Infect. Dis.* **2018**, *20*, e12886. [[CrossRef](#)]
33. Maertens, J.A.; Raad, I.I.; Marr, K.A.; Patterson, T.F.; Kontoyiannis, D.P.; Cornely, O.A.; Bow, E.J.; Rahav, G.; Neofytos, D.; Aoun, M.; et al. Isavuconazole versus Voriconazole for Primary Treatment of Invasive Mould Disease Caused by Aspergillus and Other Filamentous Fungi (SECURE): A Phase 3, Randomised-Controlled, Non-Inferiority Trial. *Lancet* **2016**, *387*, 760–769. [[CrossRef](#)]
34. Maertens, J.A.; Rahav, G.; Lee, D.-G.; Ponce-de-León, A.; Ramírez Sánchez, I.C.; Klimko, N.; Sonet, A.; Haider, S.; Diego Vélez, J.; Raad, I.; et al. Posaconazole versus Voriconazole for Primary Treatment of Invasive Aspergillosis: A Phase 3, Randomised, Controlled, Non-Inferiority Trial. *Lancet* **2021**, *397*, 499–509. [[CrossRef](#)]
35. Gao, C.A.; Bailey, J.I.; Walter, J.M.; Coleman, J.M.; Malsin, E.S.; Argento, A.C.; Prickett, M.H.; Wunderink, R.G.; Smith, S.B. NU COVID Investigators Bronchoscopy on Intubated COVID-19 Patients Is Associated with Low Infectious Risk to Operators. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Table S1. Mycological arguments for invasive pulmonary aspergillosis associated to influenza pneumonia (IAPA) and COVID-19 (CAPA) and classification.

Patient	Age/Sex	Positive Respiratory Samples	Blood Samples	IAPA Classification	CAPA Classification
#1	57/F	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 BAL and 1 TBA Positive BAL for: 1 x GM \geq 1; 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	1 x Positive GM>0.5	Probable IAPA*	
#2	40/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 TBA Positive TBA for: 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 3)	Putative IPA**	
#3	63/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 BAL and 1 TBA Positive BAL for: 2 x GM \geq 1; 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	1 x Positive GM>0.5	Probable IAPA	
#4	54/F	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 BAL and 1 TBA Positive BAL for: 1 x GM \geq 1; 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 1)	Probable IAPA	
#5	69/M	Positive BAL for: 1 x GM \geq 1 Positive TBA for: 1 x GM \geq 1	Negative (x 3)	Probable IAPA	
#6	58/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 BAL Positive BAL for: 1 x GM \geq 1; 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	2 x Positive GM>0.5	Probable IAPA	
#7	67/F	Positive BAL for: 1 x GM \geq 1	2 x Positive GM>0.5	Probable IAPA	
#8	49/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 TBA Positive TBA for: 1 x GM \geq 1	Negative (x 4)	Putative IPA	
#9	34/F	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 BAL Positive BAL for: 1 x GM \geq 1; 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 2)	Probable IAPA	
#10	60/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 TBA Positive TBA for: 2 x GM \geq 1; 2 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 5)	Putative IPA	
#11	67/M	Hyphae consistent with <i>Aspergillus</i> in a TBA Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 TBA Positive TBA for: 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 1)	Probable IAPA	
#12	51/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 BAL Positive BAL for: 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 1)	Probable IAPA	
#13	52/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 BAL Positive BAL for: 2 x GM \geq 1; 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	1 x Positive GM>0.5	Probable IAPA	
#14	63/F	Hyphae consistent with <i>Aspergillus</i> in 1 TBA Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 TBA Positive TBA for: 1 x GM \geq 1	1 x Positive GM>0.5	Probable IAPA	
#15	57/F	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 BAL, 1 TBA and 1 sputum Positive BAL for: 1 x GM \geq 1; 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR Positive TBA and sputum for: 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	2 x Positive GM>0.5	Probable IAPA	

#16	62/M	Hyphae consistent with <i>Aspergillus</i> in a 1 BAL, 1 TBA and 1 sputum Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 TBA and 1 sputum Positive BAL for: 1 x GM \geq 1 Positive TBA and sputum for: 1 x GM \geq 1; 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 1)	Probable IAPA	
#17	60/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 2 TBA Positive TBA for: 1 x GM \geq 1	Negative (x 3)	Putative IPA	
#18	48/F	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 TBA Positive TBA for: 5 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 1)		Possible CAPA
#19	78/F	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 2 TBA Positive TBA for: 2 x <i>A. fumigatus</i> PCR	1 x Positive GM>0.5		Probable CAPA
#20	78/F	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 4 TBA Positive TBA for: 4 x GM \geq 1.2 (2 x >4.5); 6 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 2)		Possible CAPA
#21	71/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 TBA Positive TBA for: 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 2)		Possible CAPA
#22	73/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 2 TBA Positive TBA for: 4 x GM \geq 1.2; 5 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 1)		Possible CAPA
#23	75/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 4 TBA Positive TBA for: 2 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 2)		Possible CAPA
#24	53/M	Positive TBA for: 1 x GM \geq 1.2; 1 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 1)		Possible CAPA
#25	46/F	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 sputum	1 x Positive GM>0.5		Probable CAPA
#26	82/F	Hyphae consistent with <i>Aspergillus</i> in a 1 BAL Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 1 TBA Positive TBA for: 3 x <i>A. fumigatus</i> PCR	Negative (x 1)		Probable CAPA
#27	69/M	Positive culture with <i>A. fumigatus</i> : 5 TBA Positive TBA for: 5 x GM \geq 1.2 (5 x >4.5); 7 x <i>A. fumigatus</i> PCR	2 x Positive GM>0.5		Probable CAPA

GM: galactomannan. BAL: broncho-alveolar lavage / TBA : tracheo-bronchial aspiration.* Probable IAPA: According to Verweij et al. (7). **Putative IPA: according to Blot et al. (3)

Table S2. Summary of reported cases of influenza associated pulmonary aspergillosis (IAPA) and COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA).

Case number	Age/ Sex	SAPS-II at ICU Admission	Corticosteroids before IA	Aspergillosis Risk Factors	Delay be- fore IPA, Days	Aspergillosis Classification	Radiological Evidence	Antifungal Therapy	Outcome (day 90)
1	57/F	60	Hydrocortisone, 13d	Chemother- apy, breast cancer	7	Probable IAPA*	Diffuse reticular or alveolar opacities well-shaped nodules	Voriconazole, 3d	dead
2	40/M	22	Hydrocortisone, 5d	Severe cirrho- sis	10	Putative IAPA**	Diffuse reticular or alveolar opacities, pleural fluid, wedge-shaped infiltrate cavitation and tree in bud	Voriconazole, 17d	alive
3	63/M	82	Hydrocortisone, 5d	n	4	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, Wedge-shaped infiltrate, cavitation and tree in bud	Voriconazole + isavuconazole, 117d	alive
4	54/F	86	n	n	3	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and wedge-shaped infiltrate	Voriconazole, 60d	alive
5	69/M	65	n	Hodgkin Lym- phoma	5	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities well-shaped nodules and cavitation	Voriconazole, 14d	dead
6	58/M	47	Hydrocortisone, 3d	n	3	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and wedge-shaped infiltrate	Voriconazole, 2d	dead
7	67/F	64	n	Myeloma	3	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, wedge-shaped infiltrate, pleural fluid, well-shaped nodules, halo sign and tree in bud	Voriconazole, 9d	dead
8	49/M	61	Hydrocortisone, 9d	Chronic lym- phocytic leuke- mia	4	Putative IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, nonspecific infiltrates and consolida- tion	Voriconazole, 54d	alive
9	34/F	47	Methylpredniso- lone, 20d	n	2	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, wedge-shaped infiltrate, pleural fluid, well-shaped nodules and tree in bud	Voriconazole, 42d	alive

10	60/M	37	Hydrocortisone, 7d	n	2	Putative IPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, nonspecific infiltrates and consolidation, pleural fluid and wedge-shaped infiltrate	Voriconazole, 47d	alive
11	67/M	48	Hydrocortisone, 8d	Corticosteroids + TNF alpha inhibitors	1	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and tree in bud	Voriconazole, 14d	dead
12	51/M	58	Hydrocortisone + methylprednisolone, 5d	Hodgkin lymphoma	0	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, well-shaped nodules, halo sign and tree in bud	Voriconazole, 42d	alive
13	52/M	68	Methylprednisolone, 8d	n	0	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, wedge-shaped infiltrate, well-shaped nodules and cavitation	Voriconazole, 17d	alive
14	63/F	59	n	n	2	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, pleural fluid, wedge-shaped infiltrate and cavitation	Voriconazole, 5d	dead
15	57/F	32	Hydrocortisone, 20d	Myeloma	2	Probable IPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, nonspecific infiltrates and consolidation and wedge-shaped infiltrate	Voriconazole, 16d	dead
16	62/M	29	n	n	9	Probable IAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, wedge-shaped infiltrate and cavitation	Voriconazole + amphotericin B, 42d	alive
17	60/M	42	n	n	17	Putative IPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, nonspecific infiltrates and consolidation, pleural fluid and wedge-shaped infiltrate	Voriconazole, 32d	dead
18	48/F	86	Methylprednisolone, 20d	Lung transplantation	6	Possible CAPA	Nonspecific infiltrates and consolidation and Wedge-shaped infiltrate	Isavuconazole, 42d	alive
19	78/F	81	Hydrocortisone, 7d	Chronic myelo-monocytic leukemia	13	Probable CAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and nonspecific infiltrates and consolidation	Voriconazole, 2d	dead
20	78/F	37	n	n	4	Possible CAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and Wedge-shaped infiltrate	Voriconazole, 21d	dead
21	71/M	35	n	n	13	Possible CAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities, nonspecific infiltrates, consolidation, pleural fluid and wedge-shaped infiltrate	Voriconazole, 42d	alive
22	73/M	34	Methylprednisolone, 7d	n	21	Possible CAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and pleural fluid	Isavuconazole, 42d	alive
23	75/M	42	Methylprednisolone, 30d	n	5	Possible CAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and Wedge-shaped infiltrate	Voriconazole, 42d	alive
24	53/M	17	n	n	3	Possible CAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and wedge-shaped infiltrate	none	alive
25	46/F	57	Methylprednisolone, 10d	n	28	Probable CAPA	Nonspecific infiltrates and consolidation and wedge-shaped infiltrate	none	alive
26	82/F	72	Hydrocortisone, 10d	n	1	Probable CAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and Wedge-shaped infiltrate and pleural fluid	Voriconazole + isavuconazole, 42d	dead
27	69/M	30	n	n	1	Probable CAPA	Diffuse reticular or alveolar opacities and Nonspecific infiltrates and consolidation	Voriconazole + isavuconazole, 42d	alive

* Probable IAPA: According to Verweij et al. (7). **Putative IPA: according to Blot et al. (3).

Table S3. Comparison of CT-scan features of CAPA patients at admission and at diagnosis.

	CT Scan at Admission (n = 9)	CT Scan at CAPA Diagnosis (n = 10)	P Value
Typical COVID-19 pattern	7 (78%)	3 (30%)	0.07
Diffuse reticular or alveolar opacities	7 (78%)	10 (100%)	0.21
Wedge-shaped segmental or lobar consolidation	6 (66.7%)	7 (70.0%)	0.86
Well-circumscribed nodule(s)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.99
Halo sign	0 (0.0%)	1 (10.0%)	0.99
Cavitation	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.99
Air-crescent sign	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.99
Tree in bud	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.99
Bronchial wall thickening	1 (11.1%)	1 (10.0%)	0.99
Pleural effusion	1 (11.1%)	4 (40.0%)	0.3

Data are presented as n (%). P values comparing CT-scan analysis of CAPA patients at admission versus CT-scan of these patients at IPA diagnosis. CT-scan: computerized-tomography scanner.



Letter to the Editor

***Herpesviridae* systemic reactivation in patients with COVID-19-associated ARDS**

Sir,

The clinical spectrum of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) infection can lead to acute respiratory distress syndrome (ARDS), associated with immune dysfunction and prolonged duration of mechanical ventilation (MV) [1], both of which are responsible for the acquisition of secondary infection [2]. Along these lines, ARDS and prolonged MV are recognized risk factors for *Herpesviridae* systemic reactivation (HSR), which may affect the outcome of critically ill patients [3,4]. However, the burden of these infectious events in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) remains poorly explored. As such, we investigated the clinical features of HSR in patients with COVID-19-associated ARDS.

All consecutive ARDS patients with COVID-19 confirmed by polymerase chain reaction (PCR) admitted to the medical intensive care unit (ICU) of Rennes University Hospital between 12th March 2020 and 16th April 2021 were reviewed. Patients monitored at least weekly for herpes simplex virus (HSV) and cytomegalovirus (CMV) systemic replication by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were analysed retrospectively.

HSR was considered when viral DNA was detected by PCR (lower limits of detection were 119 IU/mL for CMV with Altona RealStar CMV assay and 165 copies/mL for HSV-1 with Altona RealStar HSV assay). Respiratory samples for bacterial, fungal and viral (CMV, HSV and SARS-CoV-2 RT-PCR) examinations were collected at least weekly. Ventilator-associated pneumonia (VAP) was defined in accordance with international guidelines [5].

Mann–Whitney U-test was used to compare quantitative data, and Chi-squared test or Fisher's exact test, as appropriate, was used to compare qualitative data. All statistical analyses were two-sided, and $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. Analyses were performed using R Version 4.0.4. The institutional ethical review board approved the study (N 20-56).

One hundred and twenty-two patients with COVID-19-associated ARDS were included in this study. Demographic and clinical features are listed in Table 1. The majority of patients were male, and the median age was 66 years. HSR was observed in 33 patients (27%), 27 patients experienced HSV viraemia (21.9%), 13 patients experienced CMV viraemia (10.7%), and seven patients had co-reactivation. Viraemia occurred at a median of 12 days following ICU admission (interquartile range 9–22). As shown in Table 1, among patients experiencing HSR, a high proportion also presented *Herpesviridae* respiratory reactivation, while such viral respiratory reactivation was observed less often in patients without HSR (87.9% vs 23.6%; $P < 0.001$) (Table 1). Patients with HSR were lymphopenic and had positive respiratory RT-PCRs for SARS-CoV-2 for longer durations. As shown in Table 1, when analysing clinical courses, patients with HSR had a prolonged duration of MV and longer ICU stay. Finally, higher rates of VAP were observed among these patients.

In this single-centre study, 27% of patients admitted to the ICU for COVID-19-associated ARDS developed HSR. This viral reactivation appeared to be associated with prolonged duration of MV and longer ICU stay, which is consistent with previous studies [3,4]. We previously showed that respiratory CMV and HSV reactivations are often observed in critically ill COVID-19 patients [6]. Moreover, patients with sepsis, even immunocompetent patients, are recognized as being at risk for viral reactivation [7] that may be promoted by sepsis-induced immunosuppression [8]. Although associated with immune defects (i.e. prolonged lymphopenia and positive respiratory SARS-CoV-2 RT-PCR), there is no clear evidence that viral reactivation has a direct impact on patient outcomes in the ICU. Viral reactivation could also be considered as a marker for disease severity [7]. Furthermore, the pathophysiology of systemic reactivation is debated. The lungs are known to be a major site of *Herpesviridae* latency. As a high proportion of patients developing systemic reactivation also experienced previous (or concomitant) respiratory reactivation in this study, it can be hypothesized that respiratory reactivation is the first step before systemic dissemination, which may be favoured by immunosuppressive mechanisms in patients with sustained SARS-CoV-2 infection.

Finally, these results suggest that HSR is common in patients with ARDS-associated COVID-19 and may influence the clinical course of these critical patients. Direct clinical consequences of systemic *Herpesviridae* reactivation and treatment of such infections remain to be investigated.

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.11.007>

0195-6701/© 2021 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1

Characteristics of patients with severe coronavirus disease 2019 according to systemic *Herpesviridae* reactivation

	All patients N=122	No viral reactivation N=89	Viral reactivation N=33	P-value
Demographic characteristics				
Age (years)	66 (57–73)	64 (55–72)	71 (61–73)	0.044
Male sex	83 (68)	56 (62.9)	27 (81.8)	0.08
Co-existing conditions				
Obesity	48 (39.3)	44 (49.4)	4 (12.1)	<0.001
Hypertension	61 (50)	39 (44.8)	22 (66.7)	0.042
Diabetes	28 (22.9)	17 (19.1)	11 (33.3)	0.16
Previous immunosuppression	27 (22.1)	20 (22.5)	7 (21.2)	>0.99
Clinical and biological baseline features				
Lymphocyte count ($10^9/L$)	0.53 (0.39–0.83)	0.55 (0.39–0.79)	0.56 (0.38–0.81)	0.9
CRP (mg/L)	120 (78–167)	116 (76–166)	150 (90–258)	0.2
Ratio of PaO ₂ to FiO ₂ (mmHg)	102 (84–137)	106 (83–139)	100 (86–134)	0.71
SAPS II on day 1	32 (24–41)	32 (23–40)	33 (27–41)	0.36
SOFA score on day 1	4 (3–7)	4 (3–7)	5 (3–7)	0.92
Clinical courses and ICU management				
Corticosteroid use	114 (93.4)	85 (95.5)	29 (87.9)	0.27
ECMO	7 (5.7)	3 (3.4)	4 (12.1)	0.16
Duration of lymphopenia (days)	8 (5–13)	7 (4–10)	14 (9–23)	0.001
Duration of positive respiratory SARS-CoV-2 RT-PCR (days)	19 (13–27)	16 (11–24)	24 (18–31)	0.013
Ventilated patients with positive respiratory SARS-CoV-2 PCR				
Day 5 (120 patients tested)	99 (81.1)	66/87 (75.7)	33/33 (100)	<0.001
Day 10 (84 patients tested)	65 (77.4)	35/53 (66)	30/32 (93.7)	0.003
Day 15 (58 patients tested)	44 (76)	22/34 (64.7)	22/24 (91.7)	0.02
Day 20 (45 patients tested)	31 (68.9)	15/25 (60)	16/20 (80)	0.2
VAP	26 (21.3)	14 (15.7)	12 (36.4)	0.03
<i>Herpesviridae</i> respiratory reactivation	50 (41)	21 (23.6)	29 (87.9)	<0.001
Duration of mechanical ventilation (days)	13 (8–23)	12 (7–20)	18 (11–31)	0.018
Length of ICU stay (days)	16 (10–28)	13 (10–24)	23 (15–33)	0.005
Day 28 mortality	9 (7.4)	8 (9)	1 (3)	0.44

CRP, C-reactive protein; PaO₂, arterial oxygen tension; FiO₂, fraction of inspired oxygen; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; ICU, intensive care unit; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus-2; PCR, polymerase chain reaction; VAP, ventilator-associated pneumonia.

Obesity was defined as body mass index >30 kg/m²; lymphopenia was defined as lymphocyte count <1.10⁹/L; and previous immunosuppression was defined as immunosuppressive treatments including corticosteroids >0.5 mg/kg/day prednisone-equivalent within 30 days prior to inclusion, severe neutropenia <0.5 G/L of neutrophils, human immunodeficiency virus seropositivity, or bone marrow or solid organ transplantation.

Data are presented as median (interquartile range) and N (%). P-values comparing patients were tested using Mann–Whitney U-test (continuous variables), and Chi-squared or Fisher's exact tests (categorical variables).

Acknowledgements

The authors wish to thank Leo-Pol Rio for his help with data collection.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding sources

None.

Ethical approval

The institutional ethical review board approved the study (N 20-56).

Availability of supporting data

The datasets from this study are available from the corresponding author on request.

Author contributions

FR, CL, AM, AG and JMT took care of the patients, performed the literature review and wrote the first draft of the article. CP and VT performed diagnostic tests and raised critical comments on the article.

References

- [1] COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network and the COVID-ICU Investigators. Clinical characteristics and day-90 outcomes of

- 4244 critically ill adults with COVID-19: a prospective cohort study. *Intensive Care Med* 2021;47:60–73.
- [2] Silva DL, Lima CM, Magalhães VCR, Baltazar LM, Peres NTA, Caligiore RB, et al. Fungal and bacterial coinfections increase mortality of severely ill COVID-19 patients. *J Hosp Infect* 2021;113:145–54.
- [3] Coisel Y, Bousbia S, Forel J-M, Hraiech S, Lascola B, Roch A, et al. Cytomegalovirus and herpes simplex virus effect on the prognosis of mechanically ventilated patients suspected to have ventilator-associated pneumonia. *PLoS One* 2012;7:e51340.
- [4] Ong DSY, Bonten MJM, Spitoni C, Verduyn Lunel FM, Frencken JF, Horn J, et al. Epidemiology of multiple herpes viremia in previously immunocompetent patients with septic shock. *Clin Infect Dis* 2017;64:1204–10.
- [5] Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. 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:e61–111.
- [6] Le Balloch P, Pinceaux K, Pronier C, Seguin P, Tadié J-M, Reizine F. Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients. *Crit Care* 2020;24:530.
- [7] Luyt C-E, Combes A, Deback C, Aubriot-Lorton M-H, Nieszkowska A, Trouillet J-L, et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:935–42.
- [8] Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* 2018;14:121–37.

F. Reizine^{a,b,*}
 C. Liard^{a,b}
 C. Pronier^c
 V. Thibault^c
 A. Maamar^{a,b}
 A. Gacouin^{a,b}
 J.-M. Tadié^{a,b}

^aCHU Rennes, Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Rennes, France

^bUniversité Rennes 1, Faculté de Médecine, Biosit, Rennes, France

^cCHU Rennes, Service de Virologie, Rennes, France

* Corresponding author. Address: Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, CHU Rennes, F-35033 Rennes, France. Tel.: +33 2 99284248; fax: + 33 2 99284164. E-mail address: florian.reizine@chu-rennes.fr (F. Reizine)

Available online 17 November 2021

Titre : Dysfonctions lymphocytaires et perturbations immuno-métaboliques au cours des états infectieux sévères

Mots clés : Sepsis – Lymphocytes T – Mitochondrie – COVID-19 – Citrulline

Les états infectieux sévères sont caractérisés par la survenue de perturbations immunitaires responsables d'une exacerbation de la susceptibilité aux infections secondaires. L'élaboration d'un modèle murin standardisé de double infections séquentielles (un sepsis suivi 5 jours après d'une infection acquise) nous a permis d'explorer les perturbations lymphocytaires T objectivant une majoration de l'apoptose de ces cellules ainsi qu'une diminution de leurs capacités à proliférer *in vitro*. Ces dysfonctions étaient associées à la présence d'une altération de la respiration mitochondriale. D'autre part, ont été observées une augmentation de la concentration de lymphocytes T régulateurs et de MDSC ainsi qu'une diminution de la concentration en arginine. La correction de l'hypoargininémie par supplémentation en citrulline a permis la correction de l'ensemble de ces perturbations ainsi qu'une diminution

de la sévérité des infections acquises. Afin d'approfondir cette approche expérimentale, nous avons initié des analyses chez les patients atteints de COVID-19 permettant d'observer, là encore, la présence d'une lymphopénie corrélée à la sévérité ainsi que des dysfonctions lymphocytaires T associées à la survenue d'une hypoargininémie et à une majoration du risque d'infections secondaires. Enfin, a pu être objectivée la présence de populations cellulaires immunosuppressives préférentiellement chez les patients sévères. L'ensemble de ces résultats souligne le rôle clé du métabolisme de l'arginine au sein des mécanismes immunosupresseurs survenant au cours des états infectieux. La correction de l'hypoargininémie laisse entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques afin de limiter les conséquences des phénomènes immunosupresseurs induits par le sepsis.

Title : Lymphocyte dysfunctions and immuno-metabolic disturbances during severe infectious states

Keywords : Sepsis – T-Cells – Mitochondria – COVID-19 – Citrulline

Severe infectious states are characterized by the occurrence of immune perturbations responsible for an exacerbation of the susceptibility to secondary infections. The development of a standardized murine model of double sequential infections (a sepsis followed 5 days later by an acquired infection) allowed us to explore the T-cells disturbances showing an increase in apoptosis of these cells as well as a decrease in their capacity to proliferate *in vitro*. These dysfunctions were associated with the presence of an alteration of mitochondrial respiration. On the other hand, an increase in the concentration of regulatory T cells and MDSCs and a decrease in arginine concentration were observed. The correction of hypoargininemia by citrulline supplementation allowed the correction of all these perturbations as well as a decrease in the severity of secondary infections.

In order to complete this experimental approach, we have initiated explorations in patients suffering from COVID-19, allowing us to observe, once again, the presence of lymphopenia correlated to the severity of the patients as well as T-cells dysfunctions associated with the occurrence of hypoargininemia and an increased risk of secondary infections. Finally, the presence of immunosuppressive cell populations was observed in severe patients. All these results underline the key role of arginine metabolism within the immunosuppressive mechanisms occurring during infectious states. The correction of hypoargininemia suggests new therapeutic perspectives to limit the consequences of immunosuppressive phenomena induced by sepsis.

