



HAL
open science

Identification de biomarqueurs pronostiques alvéolaires et sanguins au cours du syndrome de détresse respiratoire aiguë infectieux

Inès Bendib Le Lan

► To cite this version:

Inès Bendib Le Lan. Identification de biomarqueurs pronostiques alvéolaires et sanguins au cours du syndrome de détresse respiratoire aiguë infectieux. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2022. Français. NNT : 2022PA120030 . tel-04417287

HAL Id: tel-04417287

<https://theses.hal.science/tel-04417287>

Submitted on 25 Jan 2024

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.

UPEC- Université Paris-EST CRETEIL

École Doctorale 402: Sciences de la vie et de la santé

Groupe de Recherche Clinique CARMAS

Institut Mondor de recherche biomédicale (IMRB)

Institut de recherche vaccinale (VRI) U 955, Équipe 16

Thèse en doctorat en Biologie de la Santé

Identification de biomarqueurs pronostiques alvéolaires et sanguins au cours du syndrome de détresse respiratoire aiguë infectieux

Par Mme Inès BENDIB LE LAN

Co-Dirigée par le Pr. Nicolas de Prost et le Pr. Véronique Godot

Présentée et soutenue publiquement le 24 Mai 2022

Devant un jury composé de :

Rapporteur : Pr Fabienne Venet, PU-PH, Lyon

Rapporteur : Pr Antoine Guillon, PU-PH, Tours

Examineur : Dr Guillaume Voiriot, MCU-PH, Paris

Examineur: Pr Frédéric Pène, PU-PH, Paris

Directeur de thèse : Pr Nicolas De Prost, PU-PH, Créteil

Co-directeur de thèse : Pr Véronique Godot, PU, Créteil

REMERCIEMENTS

Mes remerciements sont bien évidemment en premier lieu adressés aux Professeurs F. Venet, A. Guillon, F. Pène et G. Voiriot qui ont bien voulu accepter de faire partie de ce jury.

Je remercie infiniment le professeur Nicolas de Prost de m'avoir encadrée, épaulée et formée durant toutes ses années. Je le remercie aussi de m'avoir proposée ce sujet passionnant – et je l'espère, utile –. Je le prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour avoir accepté d'encadrer cette thèse. Je lui sais gré également de sa grande disponibilité et de ses judicieux conseils tout au long de ces années de recherche. Merci d'avoir toujours été là.

Je remercie le Pr Véronique Godot d'avoir codirigé cette thèse tout au long de ces années, de m'avoir encadrée sur le plan scientifique, méthodologique et au laboratoire, d'avoir su se rendre disponible alors que mon travail auprès des patients rendait les choses difficiles.

Je souhaite également témoigner ma profonde reconnaissance au Pr Armand Mekontso Dessap de m'avoir offert l'opportunité d'intégrer son service de médecine intensive réanimation, de m'avoir prise sous son aile et de m'avoir formée tant à la pratique clinique qu'au raisonnement scientifique.

Ce travail a également vu le jour grâce à la participation de nombreuses personnes que je tiens à remercier pour leur aide précieuse. Je pense en particulier au Docteur Asma Ferchiou ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe d'immunologie biologique de l'hôpital Henri Mondor. Je tiens aussi à adresser mes remerciements à l'équipe de pneumologie de ce même hôpital pour sa disponibilité, leur efficacité et leur bonne humeur à effectuer tous les prélèvements broncho-alvéolaires et notamment le Pr B. Maitre, le Dr F. Schlemmer, mesdames A. Alves et N. Dedrie .

Je remercie également toutes les équipes médicales, paramédicales et scientifiques que j'ai côtoyées durant mon parcours. En particulier au sein du service de réanimation de l'hôpital Henri Mondor et aussi au sein de l'équipe 16 de l'IMRB U933. La qualité de la formation prodiguée et la bienveillance de leur encadrement méritent d'être saluées.

Mes pensées et ma gratitude sont également adressées à mon époux Julien, à mon fils Pierre, à mes parents et à ma sœur pour leur amour et leur soutien inconditionnels.

Je remercie enfin mes amis et camarades qui m'ont toujours soutenue et accompagnée tout au long de ces longues années d'études et de travail: Marie Douniol, Claire Rousseau, Imène Rézine, Flora Del Amo et tous ceux qui ont toujours répondu présent.

RESUMES

Résumé en français

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est la forme la plus grave d'insuffisance respiratoire hypoxémiante aiguë et touche 10 % des patients admis en unités de soins intensifs. Les infections pulmonaires représentent la majorité des facteurs de risque du SDRA. La mortalité hospitalière du SDRA est de 40 %. Comme la plupart des interventions pharmacologiques testées dans le SDRA ont donné des résultats décevants, l'identification de biomarqueurs de gravité de la maladie, cibles thérapeutiques potentielles, est devenue un axe de recherche majeur. Alors que le sang a été l'échantillon biologique le plus couramment utilisé pour rechercher des biomarqueurs candidats, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est l'échantillon le plus proche du site de la lésion et reflète plus précisément l'environnement pulmonaire local. Dans notre travail de recherche translationnelle, nous avons concentré nos recherches sur le compartiment alvéolaire dans le contexte du SDRA induit par la pneumonie. Dans un premier temps, nous avons quantifié les NETs (*neutrophil extracellular traps*) alvéolaires et sanguins chez trente-cinq patients immunocompétents atteints de SDRA induit par une pneumonie et avons évalué leur lien avec le nombre de jours vivants sans ventilation mécanique. Nous avons observé que les NETs étaient élevés dans le sang et le LBA, que leur concentration dans le LBA était corrélée à celle de l'interleukine-8 (IL-8) et à l'infiltration alvéolaire par les polynucléaires neutrophiles, mais n'était pas associée à la mortalité ou à la durée de la ventilation mécanique. Secondairement, nous avons évalué l'interrelation des biomarqueurs de SDRA septique dans les compartiments alvéolaire et sanguin et avons exploré leur association avec le pronostic du SDRA induit par une pneumonie. Pour ce faire, nous avons quantifié 22 biomarqueurs dans le LBA et le sérum, ainsi que l'expression d'HLA-DR par les monocytes alvéolaires chez 70 patients atteints de SDRA induit par une pneumonie. Nous avons constaté que l'IL-8 était la cytokine la plus compartimentalisée et qu'un ratio de concentration LBA/sérum bas d'IL-1Ra était associé à la mortalité hospitalière. Malgré le fait qu'une diminution de l'expression monocyttaire d'HLA-DR soit utilisée comme marqueur d'immunosuppression induite par le sepsis, nous n'avons pas observé d'association significative entre l'expression d'HLA-DR monocyttaire alvéolaire et la mortalité hospitalière. Dans un troisième temps nous avons profité de la récente technique

de coloration intracellulaire en cytométrie en flux pour évaluer si l'expression d'HLA-DR par les monocytes alvéolaires était associée à leurs altérations fonctionnelles. Nous avons réalisé des tests fonctionnels sur des monocytes alvéolaires et sanguins après stimulation *in vitro* par du lipopolysaccharide (LPS). L'activité de phagocytose et la production intracellulaire du facteur de nécrose tumorale (TNF) ont été quantifiées par cytométrie en flux. Dix patients atteints de SDRA lié à une pneumonie présentaient une expression d'HLA-DR significativement plus faible à la fois sur les monocytes circulants et alvéolaires. Chez les patients atteints de SDRA lié à une pneumonie, notre étude a démontré que les monocytes ont un statut désactivé et une capacité de production de cytokines inflammatoires altérée mais conservent une activité phagocytaire similaire à celle des témoins non SDRA. Cependant, le niveau d'expression d'HLA-DR sur les monocytes alvéolaires ne semble être ni un marqueur de substitution de leur activité ni un biomarqueur pronostic du SDRA induit par une pneumonie. L'absence d'identification de biomarqueur spécifique du pronostic du SDRA doit nous pousser à faire un phénotypage plus approfondi et une analyse intégrative des sources de variation étiologique, physiopathologique et biologique afin de proposer une médecine de précision.

Mots clés en français

SDRA, biomarqueurs, HLA-DR, monocytes, NETs, neutrophiles, COVID-19, cytokines

Titre en anglais

Identification of alveolar and blood prognosis biomarkers in pneumonia-associated acute respiratory distress syndrome

Résumé en anglais

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is the most severe form of acute hypoxemic respiratory failure and affects 10% of patients admitted to intensive care units. Pulmonary infections represent the vast majority of risk factors for ARDS and are associated with septic shock in approximately two-thirds of cases. In-hospital mortality from ARDS remains as high as 40%, possibly due to a significant heterogeneity within this syndrome. As most of the pharmacological interventions tested in ARDS have given disappointing results, the identification of biomarkers of disease severity, potential therapeutic targets, has become a major research axis. While blood has been the most commonly used biological sample to search for candidate biomarkers, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid is the closest sample to the site of injury and more accurately reflects the local lung environment. In our translational research work, we have focused our research on the alveolar compartment in the context of pneumonia-related ARDS. First, we quantified alveolar and blood NETs (neutrophil extracellular traps) in thirty-five immunocompetent patients with pneumonia-related ARDS and assessed their relationship with live ventilator-free days. We observed that NETs were elevated in blood and BAL fluid and associated with interleukin-8 (IL-8) and neutrophil levels. However, elevated levels of NETs were not associated with mortality or with duration of mechanical ventilation. Secondly, we aimed at assessing the interrelation of ARDS/sepsis biomarkers in the alveolar and blood compartments and explored their association with clinical outcomes. We thus quantified twenty-two biomarkers in BAL fluid and serum and HLA-DR expression on both alveolar and circulating monocytes from seventy pneumonia-related ARDS patients. We found that IL-8 was the most compartmentalized cytokine and, after adjusting for confounding factors, lower BAL fluid-to-serum concentration ratios of IL-1Ra were associated with hospital mortality. Despite the fact that sustained decreased expression of HLA-DR on circulating monocytes is used as a surrogate marker of immune failure during sepsis, we did not observe any significant association between alveolar monocytic HLA-DR expression and hospital mortality. Thirdly, in the context of ARDS induced

by pneumonia, we took advantage of the recent technique of intracellular staining and flow cytometry to assess whether the expression of HLA-DR by alveolar monocytes was associated with their functional alterations. In this context, we performed functional tests on alveolar and blood monocytes after *in vitro* stimulation with lipopolysaccharides (LPS). Phagocytosis activity and intracellular production of tumor necrosis factor (TNF) were quantified using specific fluorochrome-conjugated antibodies. Ten patients with pneumonia-related ARDS had significantly lower HLA-DR expression on both circulating and alveolar monocytes. In patients with pneumonia-related ARDS, our study showed that monocytes have a deactivated status and an impaired inflammatory cytokine production capacity but kept similar phagocytic activity than non-ARDS controls. The level of HLA-DR expression on alveolar monocytes seems neither to be a surrogate marker of their activity nor a prognostic biomarker of pneumonia-related ARDS. The lack of identification of a specific prognosis biomarker of ARDS should encourage us to a deeper phenotyping and to systematically address the variations in aetiology, physiology and biology.

Mots clés en anglais

ARDS, biomarkers, HLA-DR, monocytes, NETs, neutrophils, COVID-19, cytokines.

École doctorale sciences de la vie et de la santé

Laboratoire Institut médical de recherche biomédical (IMRB), INSERM U955, Institut de recherche vaccinale (VRI), équipe 16, UPEC Faculté de Médecine de Créteil 8 rue du Général Sarrail 94010 Créteil cedex.

ABREVIATIONS

ACR : arrêt cardio-respiratoire
AECC : *American European conference consensus*
AF-n : *alexa fluor-n*
Ang-2 : angiotensin-2
BV-n : *blue violet-n*
CARS : *compensatory anti-inflammatory response syndrome*
CMF : cytométrie en flux
CMV : cytomegalovirus
CNIL : commission nationale de l'informatique et des libertés
CPP : comité de protection des personnes
CRP : protéine C-reactive
C_{SR} : compliance du système respiratoire
DAMP : *damage-associated molecular pattern*
DAD : dommage alvéolaire diffus
DMSO : diméthylsulfoxyde
ECD : *phycoerythrin-Texas red-X*
FITC : *fluorescein isothiocyanat*
FSC : *forward scatter*
GDS : gaz du sang
HLA-DR : *Human Leukocyte Antigen - antigen D Related*
HSV : herpès simplex virus
IGS II : indice de gravité simplifié
IMDM : *Iscove's Modified Dulbecco's Media*
IL-n : interleukine-n
LBA : lavage broncho-alvéolaire
LPS : lipopolysaccharide
MFI : *Mean Fluorescence Intensity*
NFS : numération formule sanguine
NO : monoxyde d'azote
NYHA : *new york heart association*
NETs : *neutrophil extracellular traps*
P/F : PaO₂ / FiO₂ (Pression artérielle en oxygène/ Fraction inspirée en oxygène)
PAC BLUE : *pacific blue*
PAVM : pneumonie acquise sous ventilation mécanique
PBS : *phosphate buffered saline*
PC7 : *phycoerythrin cyanin 7*
PD-1 : *programmed death-1*
PD-L1 / PD-L2 : *programmed death-ligand1/2*
PE : *phycoerythrin*
PEP : pression expiratoire positive
PerCp Cy 5.5 : *peridinin chlorophyll protein cyanin 5.5*
PFA : paraformaldehyde
PICARD : Pulmonary Immunoparalysis during septic ARDs
PNN : polynucléaires neutrophiles
Pplat : pression de plateau
RAGE : récepteur des produits finaux de glycation avancée
SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë
SIRS : *systemic inflammatory response syndrome*
SOFA : *Sepsis Organ Failure Assessment*
Sp-D : Protéine D du surfactant
SSC : *side scatter*
SVF : sérum de veau foetal
TNF- α : *Tumor necrosis factor- α*
TRALI : *transfusion related acute lung injury*

USI : unités de soins intensifs
VIH : virus d'immunodépression humaine
VILI : *ventilator induced lung injury*

AVANT-PROPOS

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) survient lorsqu'un large éventail de déclencheurs provoque une inflammation pulmonaire bilatérale aiguë et une augmentation de la perméabilité capillaire pulmonaire conduisant à une insuffisance respiratoire hypoxémique aiguë. La biopsie pulmonaire met classiquement en évidence des lésions de dommage alvéolaire diffus (DAD). Avant l'utilisation généralisée des ventilateurs mécanique pour l'insuffisance respiratoire hypoxémique, les patients ne survivaient pas assez longtemps pour être diagnostiqués avec un SDRA. De ce fait, il a fallu attendre 1967 et la description historique d'Ashbaugh et Petty dans le *Lancet*, qui ont rapporté une série de 12 patients et utilisé le terme de SDRA pour la 1^{ère} fois [1]. Bien que ces patients souffraient d'atteintes primaires hétérogènes, ils ont tous développé des tableaux d'insuffisance respiratoire aiguë présentant des traits similaires avec des infiltrats pulmonaires bilatéraux et une diminution de la compliance pulmonaire, accompagnée à l'exploration autopsique du poumon, de la présence d'une inflammation aiguë et de membranes hyalines, devenues par la suite caractéristiques du DAD [1].

Ce rapport initial a capturé l'hétérogénéité du SDRA, qui continue à présenter de nos jours des défis en matière de diagnostic et de traitement. Le SDRA peut être subdivisé en fonction de son atteinte initiale, qu'elle soit pulmonaire (pneumonie, contusion pulmonaire et aspiration) ou extra-pulmonaire (traumatisme non thoracique, sepsis non pulmonaire et transfusion). Cependant, en pratique clinique, il est difficile de différencier les deux groupes en raison d'un chevauchement substantiel. Ces différences pathologiques, biologiques et physiologiques sont fortement influencées par le micro-organisme en cause s'il s'agit d'une cause infectieuse, l'environnement pulmonaire, et surtout la réaction de l'hôte vis-à-vis de l'agression ce qui a pour effet d'amplifier l'hétérogénéité du SDRA.

Plus récemment, des méthodologies de type « *machine learning* » ont été utilisées pour identifier des sous-phénotypes distincts de SDRA et tenter de diminuer cette hétérogénéité. Des analyses *post-hoc* de grands essais thérapeutiques reposant sur l'identification de tels sous-groupes ont démontré des réponses différentielles aux interventions thérapeutiques (*e.g.*, remplissage vasculaire), mettant en évidence la possibilité de personnaliser ces interventions dans le SDRA.

L'approche physiopathologique actuelle du choc septique prend en compte l'altération des réponses immunes post-infectieuses. Nous formulons dans ce travail l'hypothèse qu'une exploration des altérations immunes et inflammatoires associées au SDRA infectieux pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques .

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
RESUMES	4
ABREVIATIONS	8
AVANT-PROPOS	10
SOMMAIRE	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS	15
I. INTRODUCTION	16
1. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë	16
1.1. Qu'est-ce que le SDRA ?	16
1.2. Étiologies du SDRA.....	23
1.3. Pronostic du SDRA	26
1.4. Prise en charge du SDRA	27
1.4.1. Ventilation mécanique protectrice.....	27
1.4.2. La curarisation.....	29
1.4.3. Soins de support.....	30
1.4.4. Pharmacothérapie.....	30
1.4.5. Thérapies de sauvetage	31
1.5. L'hétérogénéité de la réponse au traitement dans le SDRA.....	32
2. Relation hôte-pathogène dans le SDRA	34
2.1. Les pathogènes pulmonaires classiques et émergents	35
2.2. L'écologie altérée des alvéoles agressées	36
2.3. La réponse immunitaire pulmonaire anti-infectieuse innée et adaptative	39
2.3.1. Immunité innée pulmonaire	39
2.3.2. Les autres acteurs de l'immunité innée et l'épithélium pulmonaire.....	49
2.3.3. Immunité adaptative	50
2.3.4. La réparation tissulaire	55
3. Sepsis, choc septique et immunodépression post-septique	58
3.1. Choc septique : la conséquence d'une réponse inflammatoire excessive de l'hôte.....	58
3.2. Immunodépression post-septique.....	62
3.2.1. Mécanismes de l'immunodépression post-septique.....	62
3.2.2. Altération de l'immunité innée post-septique.....	67

3.2.3.	Altération de l'immunité adaptative post-septique	72
3.3.	Thérapies potentielles de l'immunodépression induite par le sepsis	75
4.	Variabilité de l'altération immune post-septique et ses biomarqueurs	78
4.1.	Altérations phénotypiques et fonctionnelles des monocytes/macrophages dans la pathogénèse du SDRA79	
4.2.	Le concept de compartimentalisation alvéolaire de la réponse immune	80
4.3.	Biomarqueurs pour l'identification de l'immunodépression post-septique.....	82
I.	Objectifs du travail.....	85
II.	RESULTATS.....	87
1.	Article 1: Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients with Pneumonia-related Acute Respiratory Distress Syndrome	87
	Understanding the Role of Neutrophil Extracellular Traps in Patients With Severe Pneumonia and ARDS87	
2.	Article 2: Alveolar compartmentalization of inflammatory and immune cell biomarkers in pneumonia-related ARDS.....	103
3.	Article 3: Functional Ex Vivo Testing of Alveolar Monocytes in Patients with Pneumonia-Related ARDS	118
4.	Article 4: Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome	136
III.	Discussion.....	149
1.	Pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) : une épée à double tranchant dans le SDRA septique	151
2.	Identification de biomarqueurs au cours du SDRA infectieux : du pronostic aux endotypes	155
2.1.1.	Compartimentalisation des biomarqueurs dans le SDRA infectieux.....	155
2.1.2.	Biomarqueurs solubles.....	157
2.1.3.	Biomarqueurs cellulaires et étude fonctionnelle des monocytes alvéolaires	160
2.1.4.	Immunopathologie du SDRA COVID-19 versus non Covid-19.....	164
3.	Limites et perspectives	170
3.1.	Limites.....	170
3.2.	Vers une définition biologique du SDRA ?.....	171
IV.	Conclusion.....	174

V. Addendum : suppléments en ligne	175
1. Supplément en ligne article 1: Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients with Pneumonia-related Acute Respiratory Distress Syndrome.....	175
2. Supplément en ligne article 2: Alveolar compartmentalization of inflammatory and immune cell biomarkers in pneumonia-related ARDS.....	191
3. Suppléments en ligne article 3: Functional Ex Vivo Testing of Alveolar Monocytes in Patients with Pneumonia-Related ARDS	207
4. Supplement en ligne article 4: Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome.....	214
VI. Bibliographie	229

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1. Délai d'apparition et évolution des lésions histologiques dans le temps (phase exsudative, phase proliférative phase et fibrose) chez les patients atteints du syndrome de détresse respiratoire aiguë. Issue de (Thille, Esteban, Fernández-Segoviano, Rodriguez, Aramburu, Vargas-Errázuriz, et al. 2013)</i>	23
<i>Figure 2. Biomarqueurs du syndrome de détresse respiratoire aiguë organisés selon les voies et les phases des lésions pulmonaires. Issue de (Blondonnet et al. 2016)</i>	26
<i>Figure 3. Les mécanismes biologiques cibles potentielles dans la prise en charge personnalisée du SDRA. Issue de (Wick et al. 2021).</i>	34
<i>Figure 4. Les mécanismes responsables de l'altération du microbiome pulmonaire. Issue de (Luyt et al. 2020).</i>	38
<i>Figure 5. Rôles des neutrophiles dans l'infection pulmonaire. Issue de (Quinton, Walkey, et Mizgerd 2018).</i>	42
<i>Figure 6. Formation des NETs. Issue de (Papayannopoulos 2017).</i>	44
<i>Figure 7. Renouvellement, polarisation et fonction des monocytes/macrophages alvéolaires. Issue de (N. R. Aggarwal, King, et D'Alessio 2014).</i>	47
<i>Figure 8. Sous-populations des lymphocytes T CD4+ dans les défenses anti-infectieuses pulmonaires. Issue de (K. Chen et Kolls 2013).</i>	53
<i>Figure 9. L'immunité anti-infectieuse pulmonaire. Issue de (A. Torres et al. 2021).</i>	55
<i>Figure 10. La réparation tissulaire pulmonaire post infectieuse. Issue de (Quinton, Walkey, et Mizgerd 2018).</i>	57
<i>Figure 11. Activation des systèmes de coagulation et du complément au cours du sepsis. Issue de (van der Poll et al. 2017).</i>	61
<i>Figure 12. Altération de l'immunité innée au cours du sepsis. Adaptée de (Bauer-Dörries, De Cupis, et Liaudet 2017).</i>	72
<i>Figure 13. Altération de l'immunité adaptative. Issue de (Venet et Monneret 2018).</i>	75
<i>Figure 14. Agents immunostimulants pour le traitement de l'immunosuppression induite par le sepsis. Issue de (L. K. Torres, Pickkers, et van der Poll 2022).</i>	78
<i>Figure 15. Compartimentalisation immunophénotypique dans le SDRA à SARS-CoV-2. Adaptée de (Ronit et al. 2021).</i>	82
<i>Figure 16. Mécanismes de formations des pièges extra-cellulaires des neutrophiles (NETs) et leurs potentiels effets. Issue de (Twaddell et al. 2019).</i>	154
<i>Figure 17. Facteurs immunopathologiques impliqués dans le SDRA COVID-19. Issue de (van de Veerdonk et al. 2022).</i>	166
<i>Figure 18. L'hétérogénéité du SDRA selon l'étiologie, la physiologie et la biologie. D'après (L. D. J. Bos et al. 2021).</i>	173

I. INTRODUCTION

1. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë

1.1. Qu'est-ce que le SDRA ?

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est défini de manière consensuelle selon plusieurs éléments [2] : **physiopathologiques**, par une atteinte aiguë inflammatoire diffuse du poumon responsable de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et du poids du poumon avec perte de l'aération tissulaire ; **cliniques**, par une hypoxémie associée à des opacités pulmonaires bilatérales responsable d'un effet shunt, d'une augmentation de l'espace mort et d'une diminution de la compliance pulmonaire ; et **histologiques**, par la présence de lésions de dommage alvéolaire diffus (œdème, inflammation, membranes hyalines, hémorragie intra-alvéolaire) [3]. Le diagnostic est effectué dans les 7 jours suivant le début de l'agression pulmonaire et/ou la survenue des 1^{ers} symptômes respiratoires [4].

Dans une large étude observationnelle - LUNG SAFE- menée dans des services de réanimation de 50 pays différents, le SDRA représentait 10,4% des admissions en unité de soins intensifs et 23,4% des cas nécessitaient un support ventilatoire, représentant 0,42 cas/lit de soins intensifs sur une période de 4 semaines [5]. La présence d'un SDRA et sa sévérité sont associés à une augmentation de la durée de séjour en réanimation et à une diminution du nombre de jours vivants sans ventilation mécanique. Le niveau de la pression de plateau (Pplat), reflétant la pression de distension du système respiratoire, et de la pression élastique du système respiratoire (ie., Pplat-Pression Expiratoire Positive) est associé à la mortalité. La prévalence du SDRA léger (défini par un rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ compris entre 200 et 300 mmHg) est de 30%, celle du SDRA modéré ($100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$) est de 47%, et celle du SDRA sévère ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$) de 23,4% parmi les 2377 patients admis en soins intensifs pour insuffisance respiratoire hypoxémique de l'étude LUNG-SAFE [5].

1.1.1. Définition physiopathologique

La physiopathologie du SDRA est complexe et soumise à de multiples sources d'hétérogénéité liées à l'individu, à la cause du SDRA, à la variation de certains traits biologiques. L'œdème pulmonaire apparaît lorsque les fluides sont filtrés de la circulation

pulmonaire vers les espaces extravasculaires plus vite qu'ils ne pourraient être éliminés. Cet œdème pulmonaire survient suite à une altération de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire (œdème *lésionnel*), par opposition aux œdèmes secondaires à une augmentation de la pression hydrostatique dans le capillaire pulmonaire. La physiopathologie du SDRA est complexe et met en jeu plusieurs phénomènes physiopathologiques intriqués :

Altération de la perméabilité endothéliale

Une microvascularisation pulmonaire saine possède plusieurs mécanismes de sécurité pour empêcher l'inondation des alvéoles dans une large gamme de pressions hydrostatiques vasculaires. En conditions physiologiques, le fluide filtré de la microvascularisation pulmonaire vers l'interstitium est largement réabsorbé dans la circulation sanguine en raison d'une faible perméabilité épithéliale alvéolaire, d'un gradient osmotique entre le vaisseau et l'interstitium, d'un gradient de pression hydrostatique allant des vaisseaux périphériques aux vaisseaux centraux, et de la circulation lymphatique associée aux puits pleuraux et médiastinaux lorsque la pression hydrostatique est excessive [6–8]. Cependant, lorsque la barrière vasculaire devient hautement perméable aux protéines et aux solutés, le gradient osmotique protéique est perdu et l'interstitium est facilement inondé.

L'endothélium pulmonaire sain inhibe largement l'inflammation et la coagulation, tandis que l'endothélium activé fait le contraire [6]. Des stimuli aussi variés que l'hypoxie, les cytokines, les chémokines, la thrombine, les leucocytes activés, les lipopolysaccharides et les motifs moléculaires associés aux dangers ou DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*), peuvent déréguler l'endothélium et augmenter sa perméabilité, ce qui a pour effet d'attirer les cellules inflammatoires [9]. L'endothélium activé recrute des polynucléaires neutrophiles activés qui libèrent leur contenu nucléaire pour former, avec les plaquettes activées, les pièges extracellulaires des neutrophiles NETs (*neutrophils extracellular traps*) [10]. Lorsque l'endothélium pulmonaire est agressé, les facteurs de coagulation généralement séquestrés par les vaisseaux interagissent avec le facteur tissulaire exprimé par les cellules épithéliales alvéolaires et les macrophages alvéolaires, déclenchant l'activation de la cascade de coagulation extrinsèque [11].

Altération de la perméabilité épithéliale alvéolaire

Au cours du SDRA, la fonction de barrière épithéliale et la clairance des fluides alvéolaires sont diminués ou inefficaces [12]. Les lésions épithéliales alvéolaires peuvent être provoquées directement par des agents pathogènes microbiens, des agressions acides (i.e., aspiration du contenu gastrique), ou une agression mécanique appelée VILI (*ventilator lung induced injury*) [13]. Certaines de ces agressions provoquent une apoptose ou une nécrose épithéliale, tandis que d'autres perturbent les jonctions intercellulaires, ce qui augmente la perméabilité épithéliale. Les facteurs circulants (i.e., les DAMP ou l'hémoglobine acellulaire) les produits microbiens, les toxines, les cellules immunitaires circulantes et les médiateurs inflammatoires peuvent aussi endommager l'épithélium [14].

Dérégulation de l'Inflammation pulmonaire

L'accumulation des leucocytes, en particulier des neutrophiles, dans l'espace alvéolaire est cliniquement et pathologiquement significative dans le SDRA. Les neutrophiles issus des patients SDRA sont activés et fonctionnellement distincts. Ils présentent en effet une chimiotaxie plus performante, une activité métabolique accrue, une apoptose retardée et une nouvelle signature transcriptionnelle [15, 16]. Les neutrophiles et les plaquettes activés interagissent dans le poumon lésé pour former les NETs, des complexes de fibres de chromatine filamenteuse et de protéines dérivées des neutrophiles [10] qui pourraient aider à séquestrer les agents pathogènes, mais aussi causer des lésions pulmonaires (Lefrançais et al. 2018). Les macrophages alvéolaires exercent à la fois des réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et peuvent contribuer à amplifier les dommages alvéolaires avec les conséquences décrites ci-dessus sur l'altération de la perméabilité épithéliale [17]. En plus de la dérégulation de l'immunité innée, l'immunité adaptative semble également jouer un rôle majeur dans la défense pulmonaire de l'hôte et dans la résolution des lésions [18].

Rôle du stress mécanique appliqué au poumon

Les forces biomécaniques contribuent également aux lésions pulmonaires et au développement ou à l'aggravation du SDRA. La prise en charge des patients souffrant d'hypoxémie sévère a toujours reposé sur la ventilation mécanique. Ainsi, le concept selon

lequel le ventilateur pourrait à la fois sauver et nuire aux patients n'est pas nouveau. Dès la description originale du SDRA par Ashbaugh et collègues en 1967 [1], la pression expiratoire positive (PEP) était déjà identifiée comme un traitement potentiellement bénéfique. A contrario, des recherches expérimentales ultérieures ont démontré que la combinaison de hauts volumes courants et d'une PEP nulle induisait un œdème pulmonaire hémorragique [19, 20]. La démonstration que des stratégies de ventilation mécanique agressives appliquées à des animaux aux poumons préalablement sains pouvaient aboutir à la constitution d'un œdème pulmonaire létal a abouti au concept de VILI. Le développement de stratégies de ventilation ayant pour objectif la réduction du VILI a constitué la principale avancée dans la prise en charge des patients atteints de SDRA [21] et un modèle de recherche clinique basée sur de la recherche translationnelle. La réduction du volume courant à 6 mL/kg vs 12 mL/kg de poids idéal théorique était associée à une réduction de mortalité [21], à une diminution des niveaux de pression de distension (Pplat) du poumon, ainsi qu'à une réduction des concentrations plasmatiques alvéolaires de marqueurs inflammatoires tels que l'interleukine-1 (IL-1), IL-6, IL-8 et le TNF- α (*Tumor necrosis factor- α*) [22]. Dans des modèles expérimentaux, certaines études suggèrent que les médiateurs circulants dérivés des poumons peuvent aggraver les lésions pulmonaires et augmenter la perméabilité épithéliale. Ce concept de *biotrauma*, mis en avant par l'étude du groupe de Slutsky en 2000, suggérait que la propagation des médiateurs inflammatoires du poumon vers la circulation systémique pouvait être un facteur expliquant la défaillance multiviscérale observée au cours du SDRA [23].

1.1.2. Définition Clinique

La définition du SDRA a été revue lors de la conférence de Berlin par la société européenne de réanimation, l'American Thoracic Society et la Critical Care Medicine en 2012 [2] (**Tableau 1**). Cela a permis de définir trois catégories de sévérité : léger, modéré et sévère. Le terme *acute lung injury* (ALI) a été remplacé par le SDRA léger. L'objectif de cette définition était de catégoriser les patients en fonction de leur sévérité et de proposer des interventions thérapeutiques ciblées. La valeur de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) a été retirée de la définition du fait de l'absence de seuil validé de pression hydrostatique permettant de catégoriser les patients comme ayant un SDRA ou un œdème pulmonaire hydrostatique.

Le diagnostic de SDRA est porté si la défaillance respiratoire n'est pas complètement expliquée par une insuffisance cardiaque ou une surcharge hydrosodée selon le jugement du clinicien. Lorsqu'il n'y a pas de facteur de risque de SDRA identifié, une évaluation objective de la fonction cardiaque devient nécessaire. De plus, un niveau minimal de pression expiratoire positive (PEP) de 5 cmH₂O, pouvant être délivré de manière invasive ou non dans le SDRA léger, a été introduit dans la nouvelle définition.

Tableau 1. Définition du syndrome de détresse respiratoire aigüe

Délai	Dans les 7 jours suivant l'agression, l'apparition ou l'aggravation des symptômes respiratoires
Imagerie thoracique	Opacités bilatérales non expliquées par un épanchement, une atélectasie lobaire /pulmonaire ou des nodules
Origine de l'œdème	Insuffisance respiratoire non expliquée par une insuffisance cardiaque, une surcharge hydro sodée. Nécessite une évaluation objective (échographie cardiaque) afin d'exclure un œdème hydrostatique si pas de facteur de risque de SDRA retrouvé
Oxygénation	
Léger	200mmHg < PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 300 mmHg avec une PEP ou CPAP ≥ 5 cmH ₂ O
Modéré	100mmHg < PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 100 mmHg avec une PEP ≥ 5 cmH ₂ O
Sévère	PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 100 mmHg avec une PEP ≥ 5 cmH ₂ O

1.1.3. Définition histopathologique

Dès la première description historique du SDRA par Ashbaugh et al. [1], sept cas avaient bénéficié d'une autopsie mettant en évidence macroscopiquement des poumons volumineux, lourds, violacés et hépatisés à la tranche de section. L'examen microscopique avait retrouvé un engorgement et une dilatation des capillaires, des atélectasies alvéolaires, de l'hémorragie interstitielle et alvéolaire, de l'œdème diffus et la présence de membranes hyalines [1]. L'inflammation diffuse et la fibrose n'étaient observées que dans le cas de décès tardif.

Quelques années plus tard, Katzenstein et al. définissaient l'entité histologique du SDRA par la présence de DAD histologique. Celui-ci est caractérisé par la présence de membranes hyalines, d'œdème interstitiel, de prolifération et de nécrose cellulaire ou de fibrose. Le DAD est considéré comme un processus évolutif sur 3 phases : exsudative, proliférative et fibrosante [3, 24]. La phase exsudative est définie par une congestion capillaire, un œdème alvéolaire, observée durant la première semaine après l'agression pulmonaire. La seconde phase, proliférative, est la phase de réparation, caractérisée par une prolifération cellulaire intense des fibroblastes et des pneumocytes de type 2. Cette phase atteint son paroxysme durant la seconde et la troisième semaine et peut aboutir à une réparation *ad integrum* du tissu pulmonaire ou évoluer vers une fibrose persistante [3]. Ces phases peuvent se chevaucher ou apparaître plus précocement [25], la phase exsudative prédomine durant la première semaine après le début de l'agression pulmonaire, alors que la phase proliférative peut apparaître plus précocement (dès la première semaine) et devient universelle après 3 semaines d'évolution. La fibrose est plus tardive et apparaît dans plus de 60% des cas au-delà de la troisième semaine (**Figure 1**). Elle est liée à la durée et à l'agression pulmonaire directe [25].

Il est évident que le SDRA concerne un groupe très hétérogène de processus pathologiques. Dès lors, aucune des définitions du SDRA proposées (AECC -*American European conference consensus*- [26], lung injury score [27], Berlin [2]) n'est assez sensible pour diagnostiquer un dommage alvéolaire diffus, marqueur histologique communément admis comme gold standard pour définir le SDRA [28]. De même, chez les SDRA sévères, seulement 58% avaient un DAD à l'autopsie [29]. La pneumonie avec une infiltration importante de polynucléaires neutrophiles était l'anomalie la plus retrouvée dans le cas de SDRA sans DAD à l'histologie [30]. Notre compréhension du DAD comme marqueur histologique du SDRA peut être biaisée car la majorité des descriptions histologiques du SDRA proviennent d'études autopsiques [29–31] et ne reflètent que les patients décédés et les plus graves.

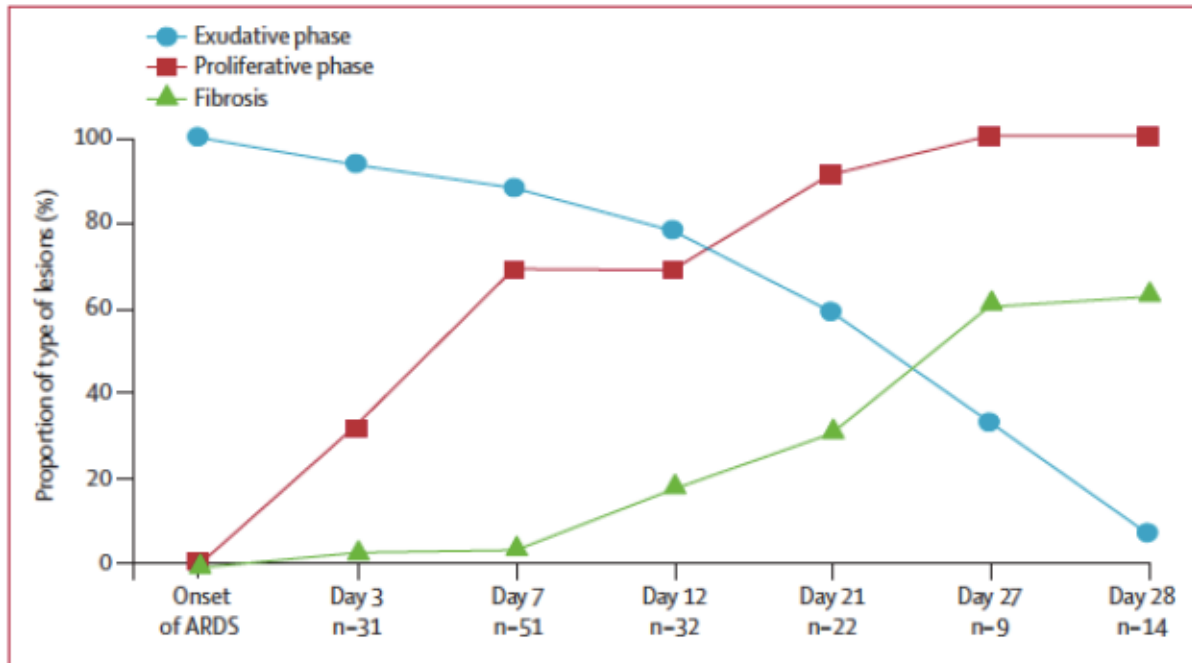
Il est clair qu'à partir des données des études autopsiques [29–31], le SDRA, syndrome clinique, ne peut être synonyme de DAD à l'histologie. De plus, le DAD peut avoir d'autres étiologies tel que les connectivites qui ne sont pas des facteurs de risque de SDRA dans la définition de Berlin. Thille et al., ont observé que 9% des 356 patients décédés de SDRA

avaient des atteintes histologiques variées autre que le DAD : pneumonie (49%), abcès pulmonaire (3%), œdème aigu du poumon (4,5%), infiltration néoplasique (4,5%), hémorragie pulmonaire (6%), pneumopathie interstitielle ou fibrose pulmonaire (4,5%), emphysème sévère (7%) et aucunes lésions histologiques dans 14% des cas [29]. De plus, dans une autre étude prospective observationnelle de biopsies pulmonaires chirurgicales effectuées dans les cas de SDRA sans étiologie évidente et persistant plus de 7 jours, il a été démontré que dans 60% des cas étaient retrouvées d'autres lésions histologiques que le DAD. Ces lésions histologiques, étaient communément observées en absence de facteurs de risque classique de SDRA, et leurs étiologies identifiées par de nombreux auteurs comme imitateurs du SDRA [32, 33].

Par ailleurs, chez les patients atteints de SDRA clinique, le fait de retrouver une variabilité des anomalies histologiques d'un sujet à l'autre, est reconnu comme étant le facteur majeur responsable de la négativité des études randomisés contrôlés dans ce domaine [34]. De ce fait, il a été suggéré d'adjoindre des biomarqueurs à la définition clinique afin de réduire l'hétérogénéité des SDRA en identifiant des sous-groupes plus homogènes [35, 36].

Une récente analyse rétrospective de grands essais randomisés contrôlés a pu permettre l'identification de deux phénotypes de SDRA basés sur la combinaison de biomarqueurs et de paramètres cliniques [37, 38]. Ces phénotypes répondaient différemment aux interventions thérapeutiques assignées de façon randomisée [37]. Des études prospectives sont requises pour valider ces phénotypes de SDRA et leur réponse thérapeutique respective. Reste à établir le set de biomarqueurs du SDRA [39] qui permettrait de définir prospectivement ces différents phénotypes [40]. Malgré une réflexion en cours sur l'intégration de biomarqueurs à la définition du SDRA, la complexité et l'hétérogénéité de la définition de ces phénotypes ont pour l'instant éloigné cette perspective.

Figure 1. Délai d'apparition et évolution des lésions histologiques dans le temps (phase exsudative, phase proliférative phase et fibrose) chez les patients atteints du syndrome de détresse respiratoire aiguë. Issue de [25]



ARDS : acute respiratory distress syndrome

1.2. Étiologies du SDRA

Depuis sa description initiale [1], le SDRA a été rapporté comme une affection clinique pouvant se développer suite à l'exposition à divers facteurs de risque (Tableau 2). Ces facteurs de risque, déjà définis par l'AECC [26], sont classés en deux catégories : directs (pneumonie, inhalation de liquide gastrique, contusion pulmonaire, noyade, vascularite pulmonaire) ou indirects (sepsis extra-pulmonaire, traumatisme grave, pancréatite, brûlures sévères, choc non cardiogénique, *transfusion related acute lung injury* ou TRALI, overdose).

Tableau 2. Facteurs de risque de SDRA

Facteurs de risque *communs* [2]

Pneumonie infectieuse
Sepsis extra-pulmonaire
Aspiration du contenu gastrique
Choc non cardiogénique
Pancréatite
Traumatisme grave ou chirurgie à haut risque (par exemple, œsophagectomie)
Overdose de drogue
Lésion d'ischémie-reperfusion

Facteurs de risque moins courants

Inhalation de fumée
Noyade
Utilisation de vapotage ou de cigarette électronique
Transfusion multiple de produits sanguins

Imitateurs du SDRA (pas de DAD histologique)

Vascularite
Hémorragie alvéolaire diffuse
Pneumopathie d'origine médicamenteuse
Pneumonie organisée
Pneumopathie d'hypersensibilité
Pneumonie aiguë à éosinophiles
Exacerbation aiguë de maladie pulmonaire interstitielle
Syndrome thoracique aigu

Protéïnose alvéolaire

Néoplasie

Les facteurs de risque les plus courants sont la pneumonie et le sepsis non pulmonaire, suivis de l'aspiration du contenu gastrique [5, 41]. Les traumatismes et la transfusion de produits sanguins labiles sont des facteurs de risque de SDRA moins courants à l'ère moderne, car la gestion des ventilateurs, des fluides et des transfusions ont évolué [5], tandis que de

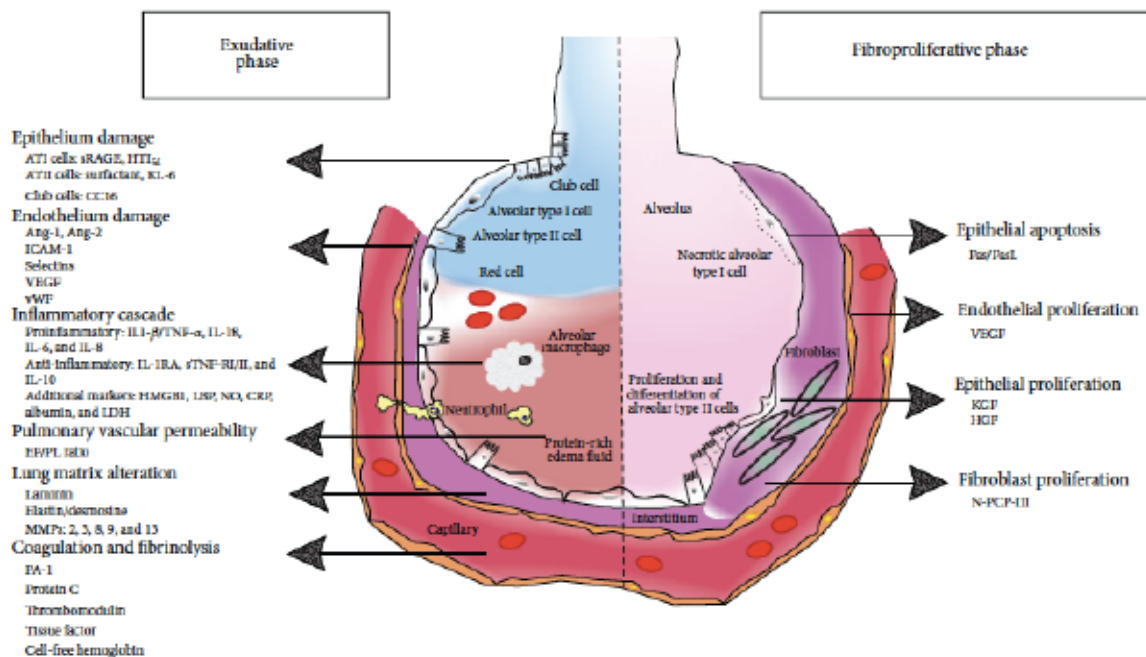
nouvelles causes telles que la cigarette électronique ou les lésions pulmonaires associées à l'utilisation de produits de vapotage (EVALI) [42] ; le SARS-CoV-2 [43] et les autres coronavirus responsables du SRAS [44] et du MERS [45] sont apparues.

Cependant, de nombreuses études cliniques et expérimentales montraient peu de différence entre les SDRA pulmonaires et extra-pulmonaires en termes de réponse inflammatoire, d'anomalies radiologiques et de réponse physiologique au traitement ventilatoire. Les catégories directes et indirectes se chevauchant à un point tel que dans la nouvelle définition de Berlin [2], la distinction entre SDRA direct et indirect n'a pas été retenue. L'intérêt majeur d'identifier, pour un même patient, un facteur de risque de SDRA est de traiter l'étiologie sous-jacente.

L'identification d'une cause spécifique du SDRA reste un objectif thérapeutique crucial pour améliorer le pronostic du SDRA [46]. Bien que la susceptibilité génétique au SDRA soit suggérée par la variabilité avec laquelle les facteurs de risque cliniques prédisent le développement du SDRA et par l'association répétée de nombreux variants génétiques au risque de SDRA, le risque attribuable à n'importe quel polymorphisme génétique particulier dans l'apparition ou dans le pronostic du SDRA s'avère très faible [47].

Par ailleurs, certains biomarqueurs sont associés au développement du SDRA dans les populations à risque. Sur un total de 37 biomarqueurs dans le plasma, sept dans le liquide céphalo-rachidien et un dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire ont été évalués dans des analyses multivariées [48]. Cinq études ont examiné l'angiopoïétine-2 (Ang-2) et sept études ont examiné le récepteur des produits finaux de glycation avancée (RAGE). Dans toutes les études, des taux plasmatiques élevés d'Ang-2 et de RAGE étaient significativement associés à un risque accru de développement du SDRA dans la population à risque. Des résultats similaires ont été observés pour la protéine D du surfactant (Sp-D) dans le plasma. En revanche, les biomarqueurs de l'inflammation tels que la protéine C-réactive (CRP), la procalcitonine, l'interleukine-6 et l'interleukine-8 n'étaient pas clairement associés au développement du SDRA. La majorité des biomarqueurs dans le plasma sont le reflet de l'inflammation dans la physiopathologie du SDRA (**Figure 2**).

Figure 2. Biomarqueurs du syndrome de détresse respiratoire aiguë organisés selon les voies et les phases des lésions pulmonaires. Issue de [49]



Domage épithélial

ATI : cellules alvéolaires type 1 : sRAGE (soluble advanced glycation endproducts) ; AII : cellules alvéolaires type 2 : Surfactant ; KL-6 : Krebs von den Lungen-6 ; Club cells : cellules cuboïdales ; CC16 : protéine des cellules claires.

Domage endothélial

Ang-1/ Ang-2 : angiopéptine-1/2 ; ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire ; sélectines ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; vWF : facteur Von Willbrand

Cascade inflammatoire

Pro-inflammatoires

IL-n : interleukines- 1 β /18/ 6/8) ; TNF- α : facteur de nécrose tumorale- α

Anti-inflammatoires

IL-n : interleukine-1RA/10 ; sTNF-RI/ sTNF-RII : récepteur soluble I/II du facteur de nécrose tumorale

Marqueurs additionnels

HMGB1 : *High mobility group box nuclear protein-1* ; LBP : *Lipopolysaccharide binding protein* ; NO : monoxyde d'azote ; CRP : protéine réactive-C ; Albumine ; LDH: lactates déshydrogénase

Perméabilité vasculaire pulmonaire

EF/PL ratio : liquide d'œdème pulmonaire / protéines plasmatiques

Altération de la matrice pulmonaire

laminine ; élastine/desmosine ; MMPs : métalloprotéinases de la matrice

Coagulation et fibrinolyse

PA-1 : activateur du plasminogène-1 ; Protein C : protéine C ; thrombomoduline ; tissu factor : facteur tissulaire ; cell-free hemoglobin : hémoglobine libre

Prolifération endothéliale : VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

Prolifération épithéliale : KGF (*keratinocyte growth factor*) ; HGF (*hepatocyte growth factor*)

Apoptose épithéliale : Fas/FasL (Fas (CD95) et son ligand FasL (CD95L))

Prolifération des fibroblastes : N-PCP-III : *NT part of procollagen III*

1.3. Pronostic du SDRA

Le SDRA est plus fréquent qu'on ne le croyait initialement. En 2016, l'étude LUNG SAFE incluant des patients dans 459 unités de soins intensifs (USI) de 50 pays a rapporté que 10 %

des patients en USI et 23 % des patients ventilés mécaniquement remplissaient les critères du SDRA [5]. La mortalité hospitalière rapportée était de 35 à 45 % [2, 5]. Même les patients dont le SDRA s'est résolu rapidement avaient un taux de mortalité de 31 % [50]. La mortalité du SDRA reste élevée. Des études observationnelles sur le SDRA modéré à sévère rapportant jusqu'à 43 % de mortalité hospitalière à 90 jours [51]. La proportion de mortalité par SDRA attribuable au syndrome lui-même, par opposition aux facteurs de risques et aux comorbidités, est difficile à déterminer. Elle serait estimée à 27-37 % dans le SDRA associé au choc septique [52]. La cause du décès est le plus souvent un choc septique et une défaillance multiviscérale, plus qu'une insuffisance respiratoire aiguë [53].

L'étude LUNG SAFE [5], la plus large étude prospective observationnelle sur le SDRA, a permis de démasquer un problème conséquent qui est le sous-diagnostic du SDRA par les cliniciens. Par conséquent, les cas sous ou tardivement diagnostiqués ne bénéficiaient pas, ou tardivement, de la prise en charge adaptée du SDRA (ventilation mécanique protectrice essentiellement). Dans cette étude, les patients ayant un SDRA léger et modéré s'aggravaient dans 19,6% des cas. Le nombre de jours sans ventilation mécanique diminuaient et la durée de séjour en réanimation augmentait avec la sévérité du SDRA. [5].

1.4. Prise en charge du SDRA

1.4.1. Ventilation mécanique protectrice

La réduction du volume courant

La ventilation mécanique ne guérit pas le SDRA, mais elle permet d'assurer les échanges gazeux et doit être conduite de manière à ne pas induire de lésions pulmonaires induites par la ventilation (VILI) ou de barotraumatisme (pneumothorax). Elle repose essentiellement sur le contrôle du niveau de distension télé-inspiratoire du poumon, dont le principal levier est la réduction du volume courant.

Le volume courant cible a évolué au cours des trois dernières décennies et notre objectif thérapeutique est passé d'un objectif de normalisation de la pression partielle de dioxyde de carbone (PCO_2) au contrôle de la distension pulmonaire [54] (« hypercapnie permissive ») [55]. Les recommandations actuelles ciblent un volume courant inférieur à 6 ml/kg de poids

corporel prédit et une pression de plateau inférieure à 30 cm H₂O [56]. Cependant, plusieurs études suggèrent que la stratégie de ventilation mécanique pourrait être personnalisée pour améliorer le pronostic du SDRA. Des lésions pulmonaires induites par la ventilation (VILI) peuvent survenir chez certains patients, même en appliquant un volume courant réduit à 6 mL/kg de poids corporel prédit et en limitant la pression de plateau à 30 cm H₂O [57–59]. Amato et al. ont mis en évidence la valeur pronostique négative d'une pression motrice > 15 cm H₂O au cours du SDRA, suggérant l'intérêt de personnaliser la ventilation en ciblant ce paramètre, même si le bénéfice d'une telle stratégie n'a pas encore été établi [60].

Pression positive en fin d'expiration (PEP)

La PEP augmente la pression moyenne des voies respiratoires et améliore l'oxygénation, mais elle contribue également à l'augmentation du volume télé-inspiratoire, principal déterminant mécanique du VILI. Le maintien de l'ouverture des voies aériennes pendant l'expiration diminue également le stress alvéolaire et le phénomène d'atélectrauma [61]. Ainsi, la question du niveau de PEP à appliquer aux patients atteints de SDRA reste complexe. En effet, les deux essais randomisés-contrôlés nord-américains comparant deux niveaux de PEP ("haut" et "bas"), fixés par des tables PEP/FiO₂, n'ont pas montré de différence de mortalité ni de réduction de la durée de ventilation mécanique [57, 62]. La meilleure compréhension du fait que certains patients, dits "recruteurs", ont la capacité d'augmenter leur volume pulmonaire aéré - et ainsi leurs variables physiologiques (e.g., compliance du système respiratoire, oxygénation, débit cardiaque) - à l'augmentation de la PEP, tandis que d'autres, dits "non recruteurs", surdistendent les zones préalablement aérées et dégradent leurs variables physiologiques [63], a abouti au design de l'étude Express [64], qui comparait une stratégie de distension alvéolaire minimale à une stratégie de recrutement alvéolaire maximal. Mercat et coll. ont ainsi pu démontrer que la stratégie de recrutement alvéolaire maximal permettait d'augmenter le nombre de jours sans ventilation mécanique et sans défaillances d'organe à J28 [64]. Cependant la mortalité n'était pas affectée. Malgré l'hétérogénéité des trois études randomisées-contrôlées comparant deux niveaux de PEP au cours du SDRA [57, 62, 64], tant sur la plan méthodologique, qu'en termes de résultats, une méta-analyse concluait finalement à un bénéfice en terme de survie à l'application d'un haut niveau de PEP dans le sous-groupe des patients ayant un rapport PaO₂/FiO₂<200 mmHg [65].

Par contre, en appliquant une stratégie agressive de PEP élevée et des manœuvres de recrutement à haute pression, la mortalité dans le groupe interventionnel était significativement augmentée, ne permettant pas de recommander cette approche [66].

Décubitus ventral

Le décubitus ventral est un traitement des patients atteints de SDRA modéré à sévère. L'étude PROSEVA a mis en évidence une réduction significative de la mortalité des patients ayant un rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ mm Hg positionnés en décubitus ventral pendant au moins 16 heures par jour [67]. Cette technique a été élargie aux patients éveillés et non ventilés souffrant d'insuffisance respiratoire hypoxémique aiguë dans le contexte de la pandémie actuelle de SARS-CoV-2 et a mis en évidence un effet bénéfique sur la réduction du risque d'intubation oro-trachéale [68, 69].

1.4.2. La curarisation

Le blocage neuromusculaire a l'avantage de diminuer la consommation en oxygène, de réduire les asynchronies patient-ventilateur responsables d'augmentation du volume courant et des pressions transpulmonaires délétères. La curarisation pourrait avoir des effets bénéfiques en limitant les efforts expiratoires, les mouvements pendulaires et en augmentant la pression transpulmonaire expiratoire. Quatre essais randomisés ont testé l'effet de l'adjonction d'un curare à une sédation profonde lors de la phase initiale du SDRA [70–73]. La mortalité est l'objectif principal d'un seul de ces essais [72]. Dans l'étude ACURASYS [72], ont été inclus 339 patients présentant un SDRA de moins de 48h d'évolution avec rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$, avec une PEEP ≥ 5 cmH₂O et un volume courant de 6 à 8 ml/Kg de poids prédit par la taille dans une étude multicentrique en double aveugle, contrôlée par placebo. Le taux de neuromyopathies acquises en réanimation n'était pas différent entre les 2 groupes. L'amélioration de la survie était observée pour les patients présentant un rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ [72]. Mais ces résultats n'ont cependant pas été confirmés par une autre étude randomisée contrôlée plus récente [73]. Selon les recommandations de la société française de réanimation (SRLF), il faut utiliser un curare en cas de SDRA avec rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ mm Hg afin de réduire la mortalité. Le curare doit être administré de manière précoce (dans les

48h après le début du SDRA), en perfusion continue, pour une durée maximale de 48 h avec réévaluation au moins quotidienne.

1.4.3. Soins de support

Bien que la gestion appropriée du ventilateur soit d'une importance primordiale dans le SDRA, la conduite optimale des soins de support est également cruciale. Dans un contexte d'augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire, une pression hydrostatique élevée dans le système vasculaire pulmonaire entraîne une inondation alvéolaire plus rapide que chez les patients dont la barrière alvéolo-capillaire est intacte [74], en même temps, une perfusion tissulaire adéquate est cruciale pour les patients atteints de défaillance multiviscérale. La gestion optimale des fluides chez les patients atteints de SDRA et en état de choc reste controversée. Cependant, pour les patients atteints de SDRA sans besoin de recourir aux vasopresseurs, une stratégie de gestion des fluides conservatrice augmentait le nombre de jours sans ventilation mécanique sans impact néfaste sur la fonction rénale [75]. Par ailleurs, les directives internationales sur les soins intensifs promeuvent une approche axée sur les objectifs du PADIS (*Management of pain, agitation or sedation, and delirium, along with immobility and sleep*) qui prône une sédation légère [76] et des essais quotidiens de respiration spontanée (Si $FiO_2 \leq 0,5$ et une $PEP \leq 8$ cm H₂O) [77].

1.4.4. Pharmacothérapie

Des décennies d'essais cliniques de pharmacothérapies dans le SDRA n'ont pas permis d'identifier de médicaments efficaces. La plupart des voies biologiques considérées comme dérégulées dans le SDRA ont été ciblées dans des essais cliniques, incluant l'inflammation, les lésions épithéliales, les lésions endothéliales et les troubles de la coagulation, mais aucun médicament ciblant ces voies ne s'est avéré systématiquement efficace [78]. En 2020, la vitamine D, ayant des effets immunomodulateurs potentiellement bénéfiques n'a eu aucun effet sur la mortalité ou le pronostic de 1360 patients SDRA [79]. De même, l'interféron- β -1a intraveineux, censé améliorer la fonction de la barrière endothéliale pulmonaire, ou les statines [80] n'ont pas eu d'effet [81].

Malgré ce bilan décourageant, certaines études de phase 2 ont identifié des médicaments potentiellement prometteurs : L'essai CITRIS-ALI159 a testé la vitamine C à forte dose contre placebo chez 167 patients atteints d'un sepsis précoce et de SDRA avec une réduction significative de la mortalité toutes causes confondues à 28 jours (30 % contre 46 %, $p = 0.03$) [82]. D'autres traitements prometteurs sont en cours d'exploration : les cellules allogéniques mésenchymateuses, le monoxyde de carbone (CO), le sévoflurane, la DNase et le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF).

Par ailleurs, les thérapies inhalées sont en cours d'exploration dans la prise en charge du SDRA précoce. Cependant, les essais de phase III sur les bêta-agonistes systémiques [83] et inhalés [84] ont été arrêtés prématurément pour futilité ou signal de danger. Il a été démontré que les corticostéroïdes inhalés réduisent la gravité des lésions pulmonaires dans des modèles expérimentaux de SDRA et ont des effets synergiques avec les bêta-agonistes dans le traitement de l'asthme et des maladies pulmonaires obstructives chroniques. Festic et al., ont démontré une amélioration de l'oxygénation chez 60 patients ayant comme facteur de risque de SDRA une pneumonie et traités par une combinaison en aérosol de budésonide et de formotérol contre placebo [85]. Actuellement, ces résultats sont testés dans un essai de phase III randomisé et contrôlé versus placebo chez des patients hospitalisés pour une pneumonie sévère avec hypoxémie [86] (ARREST, NCT04193878).

Les corticoïdes ont un effet controversé au cours du SDRA. L'essai de Steinberg, publié en 2006, était négatif sur le critère de jugement principal (mortalité à J28), mais positif sur la réduction de la durée de ventilation mécanique [87]. Il était cependant noté un effet délétère de l'intervention thérapeutique lorsqu'elle était initiée après 14 jours d'initiation de la ventilation mécanique. Plus récemment, Jesus-Villar et coll. ont rapporté un effet bénéfique sur la mortalité d'une intervention précoce par dexaméthasone (diminution du nombre de jours vivants sans ventilation mécanique à J28 et de la mortalité) [88].

1.4.5. Thérapies de sauvetage

La prise en charge des SDRA réfractaires par ECMO (extracorporeal membrane oxygenation) a connu un essor depuis la pandémie grippale H1N1 2009 et, plus récemment, au cours de la pandémie COVID-19. L'étude EOLIA n'a pas montré de bénéfice de survie d'une

stratégie d'implantation d'une ECMO chez des patients ayant un SDRA sévère [89], mais les données cliniques et les registres récents publiés pendant la crise COVID-19 ont mis en lumière le bénéfice de cette technique pour la prise en charge des patients ayant un SDRA réfractaire [90].

1.5. L'hétérogénéité de la réponse au traitement dans le SDRA

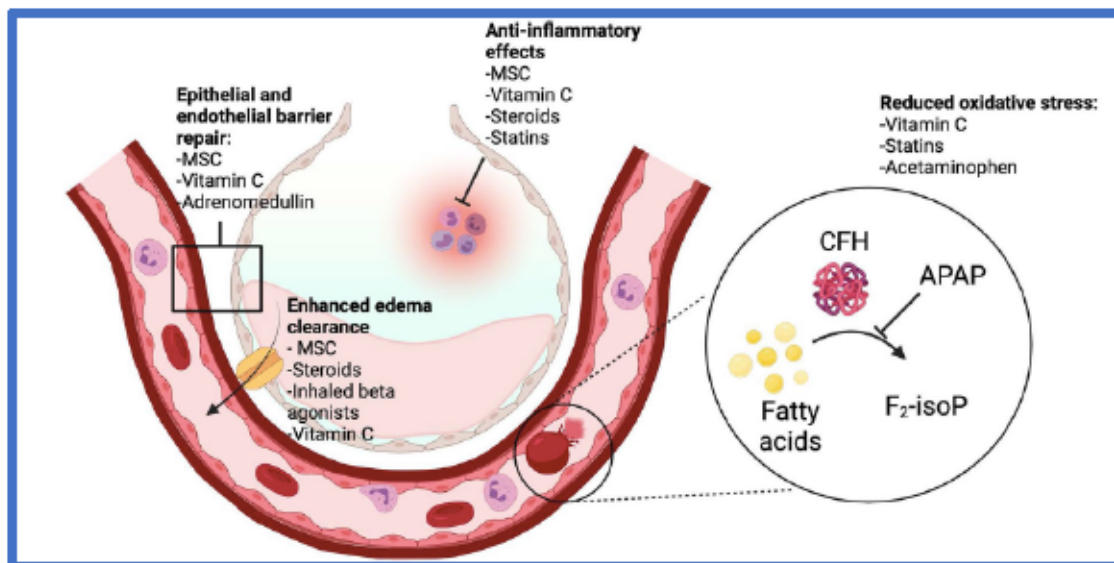
À ce jour, aucun traitement pharmacologique spécifique ne s'est avéré efficace contre le SDRA. D'innombrables agents pharmacologiques, qui se sont révélés prometteurs dans les études précliniques, se sont révélés inefficaces dans les essais cliniques. Cette lacune est attribuée en partie à l'hétérogénéité clinique et biologique du SDRA humain [91]. La capacité limitée à identifier rigoureusement les sources potentielles d'hétérogénéité a entravé la faisabilité d'une approche médicale de précision dans la prise en charge du SDRA. De plus, les thérapies de support, y compris différentes gestions des fluides et de la sédation, contribuent à une hétérogénéité clinique supplémentaire et pourraient influencer à la fois la réponse thérapeutique et le pronostic des patients. De plus en plus d'éléments suggèrent que des sous-groupes de patients, identifiés par un phénotypage à la fois clinique et moléculaire, pourraient présenter des réponses différentes aux interventions thérapeutiques jugées inefficaces pour l'ensemble de la population [37, 38], renouvelant ainsi l'espoir d'une possible approche thérapeutique personnalisée du SDRA.

Au moins deux phénotypes biologiques du SDRA ont été identifiés [37, 92]. Ces phénotypes semblent répondre différemment aux thérapies de support classiques et expérimentales [38, 93]. La compréhension non seulement de la biologie du SDRA, mais aussi de sa présentation clinique et de sa chronologie, est une étape clé pour faire avancer la médecine personnalisée (**Figure 3**) [94]. Des phénotypes inflammatoires généralement définis comme hyperinflammatoires/réactifs et hypoinflammatoires/non inflammatoires avec des résultats cliniques distincts ont maintenant été décrits dans différents contextes dans plusieurs études sur le SDRA [37, 38, 92, 93, 95]. Récemment, ces phénotypes inflammatoires ont été décrits à la fois dans la COVID-19 [96] et chez des patients souffrant d'insuffisance respiratoire hypoxémique aiguë [97]. Ainsi, ces phénotypes peuvent représenter des « spécificités traitables », au-delà de la définition syndromique actuelle du SDRA. Dans une

analyse secondaire de l'essai HARP-2 (Simvastatine 80 mg *versus* placebo chez les patients atteints de SDRA), les patients du sous-groupe hyperinflammatoire avaient une survie à 28 jours significativement augmentée lorsqu'ils étaient randomisés sous simvastatine [93]. En revanche, dans une analyse secondaire de l'étude SAILS (Rosuvastatine 10 mg *versus* placebo chez les patients atteints de SDRA induit par le sepsis), il n'y avait aucun effet du traitement dans les deux groupes [95]. Cette différence peut être liée à des différences dans la population de l'étude (toutes causes *versus* liées au sepsis) ou aux statines utilisées (différences de dose et d'hydrophilie).

La pandémie de COVID-19 a fourni l'opportunité d'étudier les effets de traitements sur des grandes populations de patients ayant des SDRA secondaires au même facteur de risque (pneumonie à SARS-CoV-2). Cette pandémie d'infections virales respiratoires a considérablement augmenté l'incidence du SDRA. Les traitements au bénéfice incertain dans le SDRA hors COVID-19, dont les corticoïdes et les antagonistes spécifiques du récepteur de l'IL-6, ont démontré leur efficacité pour prévenir la progression de la maladie et réduire le risque de décès chez les adultes hospitalisés atteints de formes sévères de COVID-19, avec des effets additifs [98–100]. Les résultats de ces études soulignent aussi l'importance du *timing* des interventions dans l'évolution de la maladie. Dans l'essai RECOVERY, un traitement avec 6 mg de dexaméthasone pendant 5 à 10 jours a entraîné un bénéfice majeur en termes de survie chez les patients recevant une supplémentation en oxygène, mais pas chez ceux atteints d'une maladie précoce ou légère ne nécessitant pas d'oxygène [101]. Ce résultat suggère une réponse au traitement hétérogène selon le stade et la gravité de la maladie elle-même.

Figure 3. Les mécanismes biologiques cibles potentielles dans la prise en charge personnalisée du SDRA. Issue de [94].



APAP: acetaminophen (paracetamol) ; CFH : cell free hemoglobin (hémoglobine libre) ; F₂-isoP: Isoprostanes ; MSC : *mesenchymal stem cells*.

Bien que ces données soutiennent le concept d'une approche de médecine de précision avec un traitement pharmacologique, il est important de souligner que pour permettre la traduction de cette approche en essais cliniques prospectifs et par la suite en pratique clinique, il faut impérativement savoir identifier rapidement les différents phénotypes au chevet du patient en temps réel. Il est probable que des biomarqueurs plasmatiques, qui ne sont pas disponibles en routine, seront nécessaires pour identifier plus précisément ces phénotypes inflammatoires. Le manque actuel de tests au lit du patient représente un obstacle important à la mise en œuvre clinique des phénotypes du SDRA.

2. Relation hôte-pathogène dans le SDRA

L'étude LUNG-SAFE a permis d'identifier la pneumonie comme principal facteur de risque de SDRA (59,4%), alors que les autres facteurs de risque représentaient moins de 16% chacun, notamment le sepsis extra-pulmonaire. La plupart des stratégies préventives et thérapeutiques du SDRA visent à atténuer l'inflammation et les lésions de l'hôte. Ce modèle de pathogenèse s'applique au SDRA et à la pneumonie et pourrait expliquer l'étendue du

chevauchement clinique entre ces deux entités. La pneumonie est la cause la plus fréquente de SDRA [5] et environ la moitié des patients atteints de SDRA développent une pneumonie secondaire lors de leur prise en charge en soins intensifs [102].

2.1. Les pathogènes pulmonaires classiques et émergents

Hors contexte pandémique, l'infection bactérienne à *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) est la cause la plus fréquente de pneumonie aiguë communautaire (PAC) grave. Les diagnostics rapides et les tests moléculaires ont amélioré l'identification des agents pathogènes coexistant. Cependant, la mortalité chez les patients admis en soins intensifs reste élevée.

S. pneumoniae est la bactérie la plus fréquemment identifiée dans les PAC, quels que soient l'âge et les comorbidités [103], avec une prévalence globale de 41,7 % et plus de 80 % de toutes les causes de bactériémie [104]. Les autres agents pathogènes impliqués dans les PAC sévères sont les virus respiratoires (grippe, H1N1, H3N2, virus respiratoire syncytial (VRS), coronavirus saisonniers principalement), des bactéries atypiques, notamment *Legionella pneumophila*, *Mycoplasme pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* (y compris résistants à la méthicilline ou SARM), des bactéries à Gram négatif et, rarement, des anaérobies peuvent également être impliqués selon les facteurs de risques et les comorbidités.

Des études récentes utilisant des techniques de biologie moléculaire (*Polymerase chain reaction* ou PCR) ont retrouvé une fréquence croissante d'étiologie virale chez les patients en soins intensifs atteints de pneumonie grave, mais souvent en association avec un pathogène bactérien [105, 106]. Dans ce contexte, il y existe une incidence élevée de pneumonie bactérienne post-grippale avec une mortalité significative allant jusqu'à 10 % avec la grippe saisonnière et pandémique [107]. Les agents viraux les plus souvent retrouvés sont : le rhinovirus (8 %), la grippe (6 %), le métapneumovirus, le VRS, le *parainfluenzae*, le coronavirus et l'adénovirus [108]. La grippe peut entraîner une pneumonie virale primaire ou une infection bactérienne secondaire à pneumocoque, à *S. aureus* ou à *H. influenzae*. Les pandémies sont devenues une préoccupation mondiale avec de multiples épidémies, principalement avec la grippe A (H1N1) en 2009, la nouvelle grippe A d'origine aviaire (H7N9) en 2013 et dans les deux cas, des co-infections bactériennes fréquentes à *S. pneumoniae* [109]. Plus récemment,

la nouvelle maladie à coronavirus (SARS-CoV2) originaire de Wuhan, en Chine, apparue depuis fin 2019 (la COVID-19) s'est transformée en une pandémie mondiale avec des taux de mortalité élevés submergeant les systèmes de santé dans de nombreux pays [110].

Une incidence de 6 % des agents pathogènes de type *P. aeruginosa*, Enterobacteries avec β -lactamases à spectre étendu et SARM est rapportée dans une cohorte de 1 597 patients atteints de pneumonie [111]. La prévalence du SARM chez les patients atteints de pneumonie grave est estimée à 3 %, principalement retrouvé chez des patients ayant des antécédents d'infection ou de colonisation, d'infections cutanées récurrentes ou chez les personnes atteintes de pneumonie grave [112]. Chez les patients immunodéprimés les germes fréquemment retrouvés sont le *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, le virus respiratoire syncytial, *Pneumocystis*, *Aspergillus fumigatus* et *Nocardia* sp. [113].

2.2. L'écologie altérée des alvéoles agressées

Même chez les individus en bonne santé, les poumons sont soumis à une inoculation bactérienne constante provenant des voies respiratoires supérieures [114, 115]. Cependant, contrairement à l'intestin, l'espace alvéolaire est un environnement écologiquement défavorable pour la survie et la reproduction de la plupart des bactéries [115]. La cause majeure de leur faible reproduction dans l'alvéole est le manque de substrat nutritif pour le métabolisme bactérien. Contrairement à la lumière intestinale qui offre une abondance de sources d'énergie protéiques et glucidiques, l'alvéole est vide à l'exception de la fine couche bactéricide de surfactant riche en lipides qui tapisse l'épithélium. Du point de vue des bactéries, les alvéoles saines sont inhospitalières. Néanmoins, en cas de lésion alvéolaire, comme dans le SDRA ou la pneumonie, les conditions environnementales sont brusquement modifiées. Les alvéoles sont inondées de liquide riche en protéines, fournissant une nouvelle source d'énergie pour la reproduction des bactéries. La couche de surfactant bactéricide est inactivée [116, 117] et l'élimination microbienne est ralentie par une altération de la clairance muco-ciliaire [118]. Le microbiote alvéolaire subit alors des modifications importantes et des bactéries digestives prennent une proportion plus importante [102].

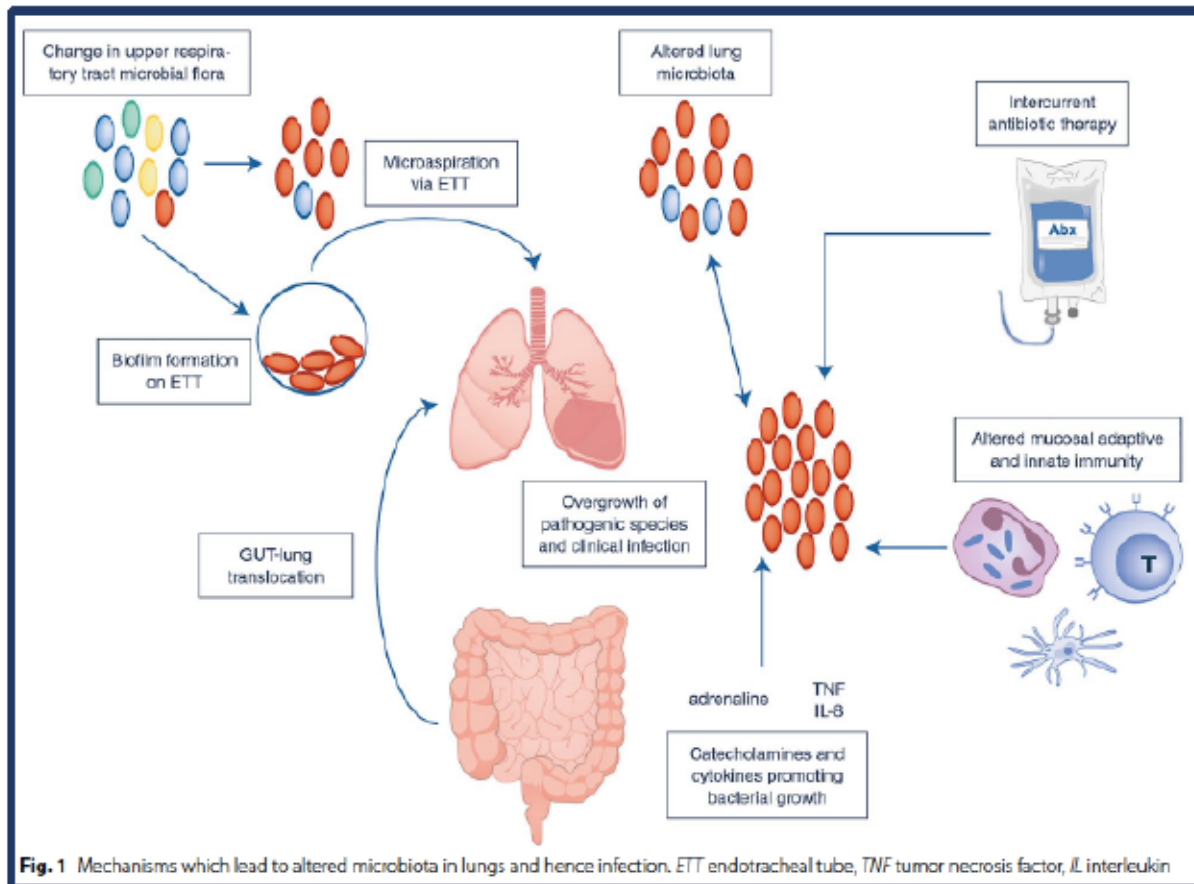
L'approvisionnement en nutriments n'est pas la seule façon dont l'écologie de l'alvéole se modifie chez les patients gravement malades. L'œdème pulmonaire crée des gradients

d'oxygène abrupts modifiant la composition du microbiote alvéolaire [119]. Les cellules de l'immunité innée activées (macrophages et neutrophiles) affluent et contribuent à l'augmentation de la concentration alvéolaire des molécules liées à la réponse de l'hôte au stress [17]. Ces signaux de stress moléculaire (catécholamines et cytokines inflammatoires) affectent les bactéries [120]. Dans les échantillons de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humains, l'augmentation de la concentration des catécholamines corrèle fortement à l'effondrement de la diversité du microbiote alvéolaire en faveur d'une espèce dominante, le plus souvent le *P. aeruginosa* [121]. De ce fait, n'importe quelle source de stress alvéolaire, agression directe (aspiration, VILI) ou indirecte (sepsis, choc), peut induire une cascade inflammatoire et un orage catécholaminérgique responsable de la sélection de bactéries virulentes déstabilisant le microbiote alvéolaire perpétuant l'inflammation locale. Le réseau d'interactions entre le microbiote pulmonaire et l'inflammation alvéolaire est de ce fait complexe, dynamique et bidirectionnel.

Les altérations précoces du microbiote pulmonaire, notamment l'augmentation de la charge bactérienne et la formation de biofilms, l'enrichissement en bactéries intestinales et la perte de diversité, sont associées au risque de SDRA et à la durée de ventilation mécanique chez les patients gravement malades [122]. Une dysbiose préexistante, comme celle induite par la fumée de tabac, peut également influencer le développement du SDRA après un traumatisme majeur [123]. Les moteurs de ces changements ne sont pas complètement compris mais sont multifactoriels, avec des mécanismes possibles illustrés dans la **Figure 4**.

Figure 4. Les mécanismes responsables de l'altération du microbiome pulmonaire.

Issue de [102].



Une partie de la complexité des infections pulmonaires provient de l'interaction entre l'hôte agressé et son microbiome pulmonaire. Les altérations précoces du microbiome pulmonaire, notamment l'augmentation de la charge bactérienne et la formation de biofilms, l'enrichissement en bactéries intestinales et la perte de diversité, sont associées au risque de SDRA et à la durée ventilation mécanique chez les patients admis en soins intensifs. Une dysbiose du microbiote pulmonaire peut être induite par l'intubation endotrachéale, l'usage de catécholamines qui promeuvent la prolifération bactérienne, l'usage d'antibiotique responsable d'une modification du microbiote intestinal et l'altération de l'immunité innée et adaptative post-septique. ETT : tube endotrachéal ; TNF : facteur de nécrose tumorale ; IL : interleukine

2.3. La réponse immunitaire pulmonaire anti-infectieuse innée et adaptative

Que les germes dans les poumons dépassent ou non la capacité de l'hôte à maintenir l'homéostasie pulmonaire dépend d'une intégration complexe de processus physiologiques, qui visent à prévenir l'apparition de l'infection pulmonaire. Pour que ces processus soient efficaces, ils doivent fournir des niveaux adéquats de résistance immunitaire et de résilience tissulaire [124]. La réponse immunitaire fait référence à l'éradication des agents pathogènes, tandis que la résilience tissulaire implique la prévention et/ou la résolution des lésions résultant de l'agent pathogène et/ou de la réponse de l'hôte à l'agent pathogène. La réponse immunitaire pulmonaire anti-infectieuse repose sur l'immunité innée et l'immunité adaptative.

2.3.1. Immunité innée pulmonaire

L'immunité innée représente le déterminant préexistant initial de la résistance contre les agents pathogènes infectants. La défense antimicrobienne dans les voies respiratoires inférieures repose alors sur une réponse immunitaire soigneusement coordonnée qui comprend à la fois des caractéristiques résidentes et recrutées. Les défenses résidentes telles que les facteurs antimicrobiens solubles dans le liquide de revêtement des voies respiratoires et les macrophages alvéolaires fournissent le niveau initial de protection, suivis rapidement par la suite par des éléments recrutés tels que les leucocytes extravasés et d'autres constituants plasmatiques immunomodulateurs.

Polynucléaires neutrophiles

Les neutrophiles sont les premiers leucocytes à être recrutés sur les sites d'inflammation en réponse aux facteurs chimiotactiques libérés par les macrophages activés et les cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires [125, 126]. Aux sites d'inflammation, les neutrophiles libèrent plusieurs facteurs antimicrobiens tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les peptides antimicrobiens et plusieurs protéinases, ces dernières contribuant également à dégrader la matrice extracellulaire pendant leur migration [127], ainsi que la formation de pièges extracellulaires ou NETs [128]. Bien que les neutrophiles

fournissent une première ligne de défense antimicrobienne, un recrutement et une activation excessifs peuvent entraîner des lésions tissulaires et une altération secondaire de la fonction pulmonaire [129].

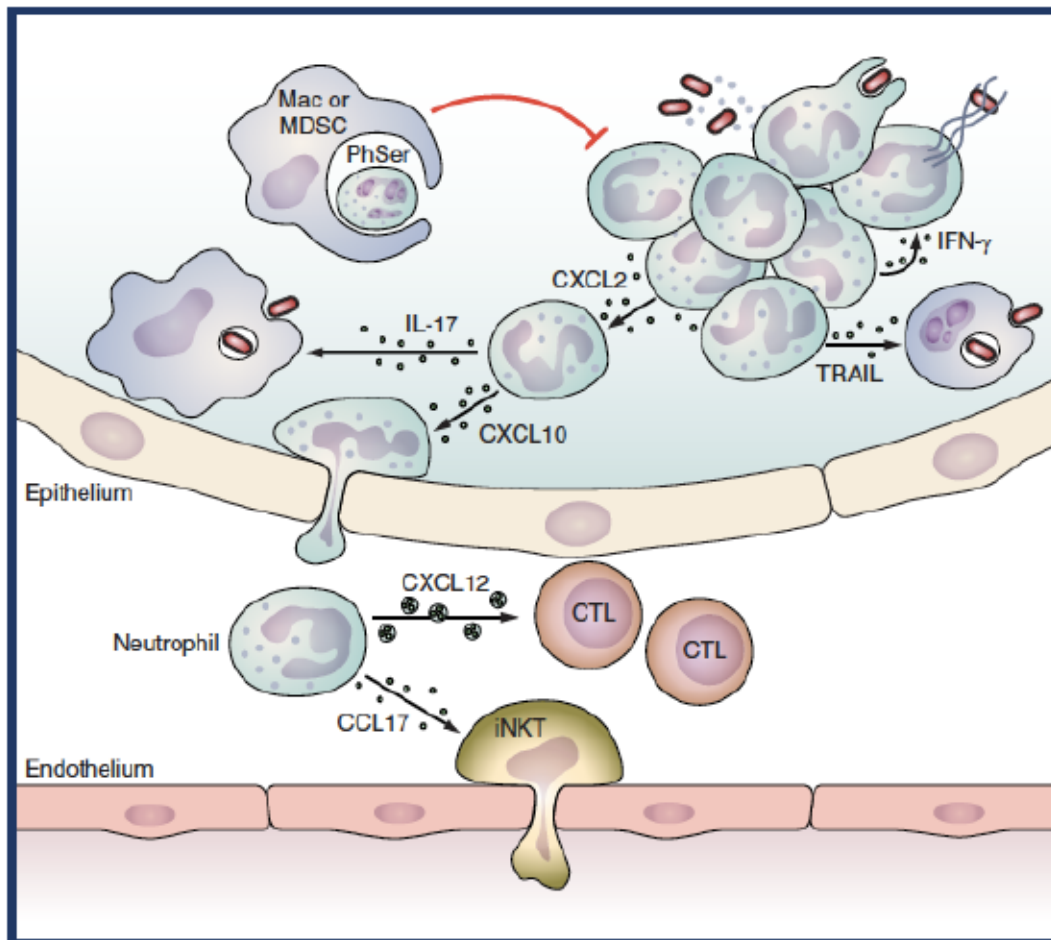
Les neutrophiles ont des rôles nombreux et divers au cours de l'infection pulmonaire en tant qu'effecteur et également en tant qu'immunomodulateur. Les rôles effecteurs comprennent l'élimination microbienne par phagocytose et la dégranulation ainsi que la formation de NETs. Les rôles affecteurs comprennent des activités qui améliorent les activités antimicrobiennes d'autres cellules, telles que la stimulation des macrophages par l'IL-17 et le recrutement de leucocytes antimicrobiens comme les lymphocytes NK invariants (iNKT) et T cytotoxiques (CTL) (via CXCL12, CCL17, CXCL10, CXCL2). Les signaux fournis par les neutrophiles apoptotiques sont immunorégulateurs, améliorant la résolution de l'inflammation.

Les principaux moyens de destruction médiés par les neutrophiles sont 1) la phagocytose, au cours de laquelle la fusion phagolysosomale expose les organismes ingérés aux espèces réactives de l'oxygène (via l'activité NADPH-oxydase) et à l'acidité ; 2) la dégranulation, au cours de laquelle les granules libèrent des facteurs toxiques tels que la myéloperoxydase (MPO), la gélatinase B (MMP9), les cathepsines, les défensines et d'autres protéines antimicrobiennes dans le phagosome et/ou l'espace extracellulaire ; et 3) la libération des NETs, qui résulte du largage d'ADN associé à des histones et à des protéines antimicrobiennes dérivées de granules, dans le milieu extracellulaire pour tuer les bactéries [128] (**Figure 5**).

Cependant, des données d'études animales et cliniques humaines soulignent le rôle majeur des neutrophiles dans le développement du SDRA. La concentration des neutrophiles dans le LBA des patients atteints de SDRA est corrélée à la fois à la sévérité de la maladie et au mauvais pronostic [130, 131]. Les patients atteints de SDRA ont un taux plus élevé de neutrophiles dans le LBA que les sujets contrôles [132]. La persistance du recrutement des neutrophiles dans le poumon paraît jouer un rôle dans la pathogenèse de cette maladie, car le nombre de neutrophiles dans le LBA reste plus élevé chez les patients qui décèdent par rapport au survivants [133]. Il a également été démontré, *in vitro*, que les neutrophiles isolés de patients atteints de SDRA septique compromettent l'intégrité des cellules endothéliales [134]. Cependant, malgré une association évidente entre le SDRA et le recrutement alvéolaire

des neutrophiles, il a été difficile d'établir une relation causale directe entre la neutrophilie et l'altération de la barrière endothéliale-épithéliale ou le pronostic du SDRA qui sous-tend un mécanisme plus complexe. Le rôle clé des neutrophiles dans la pathogenèse du SDRA a été conforté par des modèles expérimentaux montrant que leur élimination diminuait la gravité des lésions pulmonaires aiguës [135] ainsi que par l'observation clinique selon laquelle la récupération de la neutropénie chez les patients neutropéniques atteints de lésions pulmonaires était associée à une détérioration de la fonction pulmonaire [136].

Figure 5. Rôles des neutrophiles dans l'infection pulmonaire. Issue de [137].

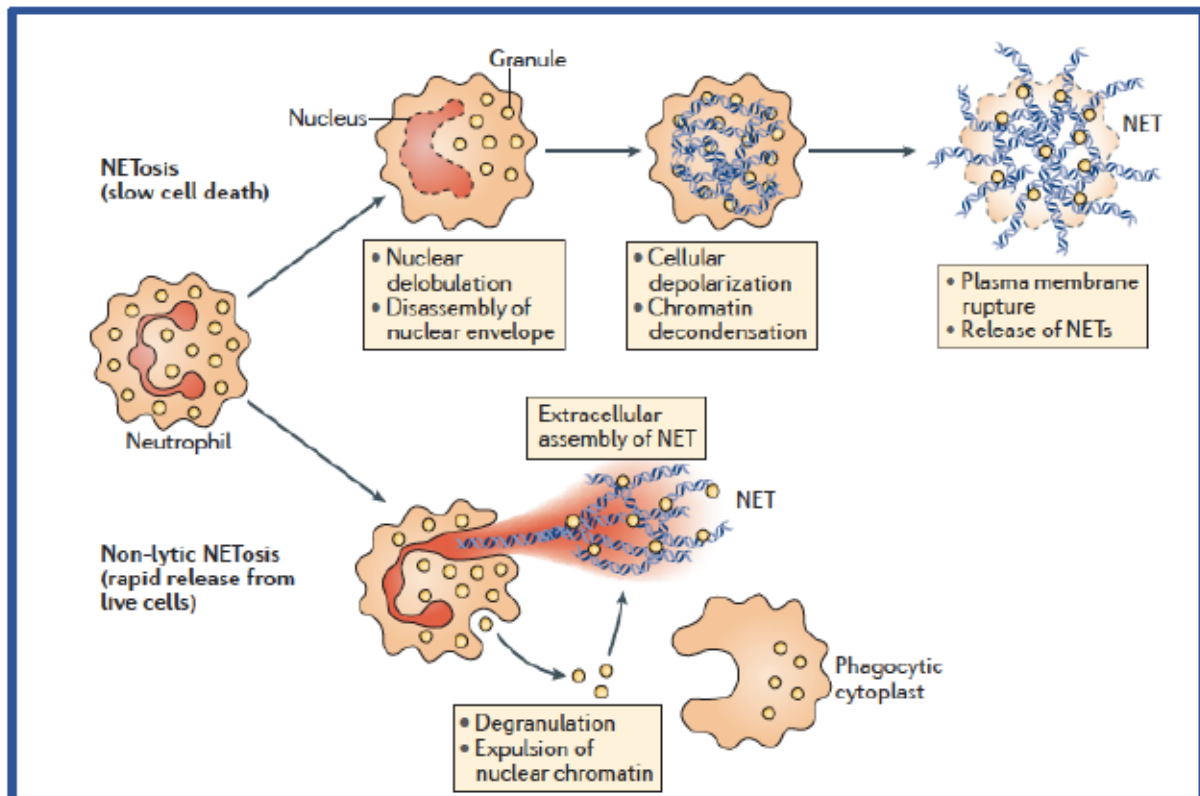


Les rôles effecteurs : l'élimination microbienne par phagocytose et la dégranulation ainsi que la formation de NETs (en haut à droite). Les rôles immunomodulateurs : stimulation des macrophages par l'IL-17 et le TRAIL et la stimulation des neutrophiles par l'IFN-gamma, recrutement de leucocytes antimicrobiens comme iNKT et CTL (via CXCL12, CCL17, CXCL10, CXCL2). PhSer : phosphatidylsérine, Mac/ MDSC : *Myeloid derived suppressive cells* ; CTL : lymphocytes T ; iNKT : lymphocyte T invariants natural killer; TRAIL : *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*.

Un autre élément important de la défense innée de l'hôte est la libération de NETs, par le biais d'un processus de mort cellulaire connu sous le nom de NETose [128]. La formation de NETs implique la désintégration de la membrane nucléaire, la condensation de la chromatine et la libération d'ADN et de protéines granulaires dans l'espace extracellulaire (20). La NETose peut être initiée par divers composants viraux, bactériens ou fongiques et par des facteurs hôtes tels que le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) ; l'HMGB1 (*high-mobility group box 1*) ; les plaquettes activées [138, 139] ou les oxydants NADP/NADPH+ [140] (Figure 6). Bien que les NETs aient de puissantes propriétés antimicrobiennes, elles contiennent des histones, des enzymes et des peptides qui sont

potentiellement toxiques pour les cellules hôtes : l'inhibition des histones a réduit la mortalité dans les modèles murins de sepsis induite par le LPS, le TNF et la ligature cœcale, tandis que les histones extracellulaires ont directement causé des lésions alvéolaires et une hémorragie pulmonaire [141]. Suite à l'infection par le virus de la grippe H1N1, les NETs étaient associés aux alvéoles lésées dans les poumons des souris infectées, tandis que, *in vitro*, les neutrophiles ont libéré des NETs à la surface des cellules épithéliales infectées par la grippe et ont causé des lésions cellulaires [142]. Des NETs ont également été observées dans les lésions pulmonaires aiguës liées à la transfusion de produits sanguins labiles (TRALI) dans des modèles murins et humains. Inhiber les histones extracellulaires ou utiliser la DNase pour dégrader les NETs protégerait contre le TRALI [143]. De plus, la faible clairance des NETs dans le poumon lésé peut potentialiser la pathogenèse de la maladie [144]. L'inhibition de la formation de NETs, ou de leurs composants clés, pourrait donc être une voie d'intervention thérapeutique potentielle dans le SDRA.

Figure 6. Formation des NETs. Issue de [145].



Les pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) se forment selon deux voies : La première est une voie de mort cellulaire appelée NETose qui commence par la délobulation nucléaire et le désassemblage de l'enveloppe nucléaire et se poursuit par la perte de la polarisation cellulaire, la décondensation de la chromatine et la rupture de la membrane plasmique. La seconde est une forme non lytique de NETose qui peut survenir indépendamment de la mort cellulaire et implique l'expulsion sécrétée de la chromatine nucléaire qui s'accompagne de la libération de protéines granulaires par dégranulation. Ces composants s'assemblent de manière extracellulaire et laissent derrière eux des cytoplastes anucléés actifs qui continuent à ingérer des micro-organismes.

Monocytes/Macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires (MA) résidents forment 90 à 95 % du contenu cellulaire des alvéoles en conditions normales, ce qui en fait les « gardiens » naturels du système respiratoire [146, 147]. Les macrophages alvéolaires interagissent réciproquement avec les cellules épithéliales alvéolaires, les cellules dendritiques et les lymphocytes T via un réseau de récepteurs de surface cellulaire et de chimiokines/cytokines pour ajuster finement la réponse immunitaire aux agents pathogènes environnementaux dans les poumons [146, 148].

Sur le plan phénotypique, classés selon les réponses aux stimuli environnementaux, il existe deux états clefs de polarisation des macrophages alvéolaires : le phénotype inflammatoire (M1) et le phénotype anti-inflammatoire (M2) [146].

Le premier type est principalement observé dans les alvéoles pour les monocytes/macrophages recrutés. Lorsqu'un stimulus se produit, comme dans le SDRA, les monocytes du sang périphérique sont recrutés dans la lumière alvéolaire, où ils se différencient en phénotype M1 [149, 150]. Le second type est observé pour les macrophages résidents à longue durée de vie, qui sont situés à l'interface air-tissu [150]. En tant que type cellulaire prédominant dans les espaces aériens alvéolaires, ils agissent comme une population uniforme, quiescente et immunosuppressive à l'état normal [151]. Le phénotype M2 est la forme principale de ces macrophages résidents. Tout déséquilibre dans la polarisation des macrophages M1/M2 peut avoir des effets néfastes entraînant diverses maladies ou états inflammatoires [152].

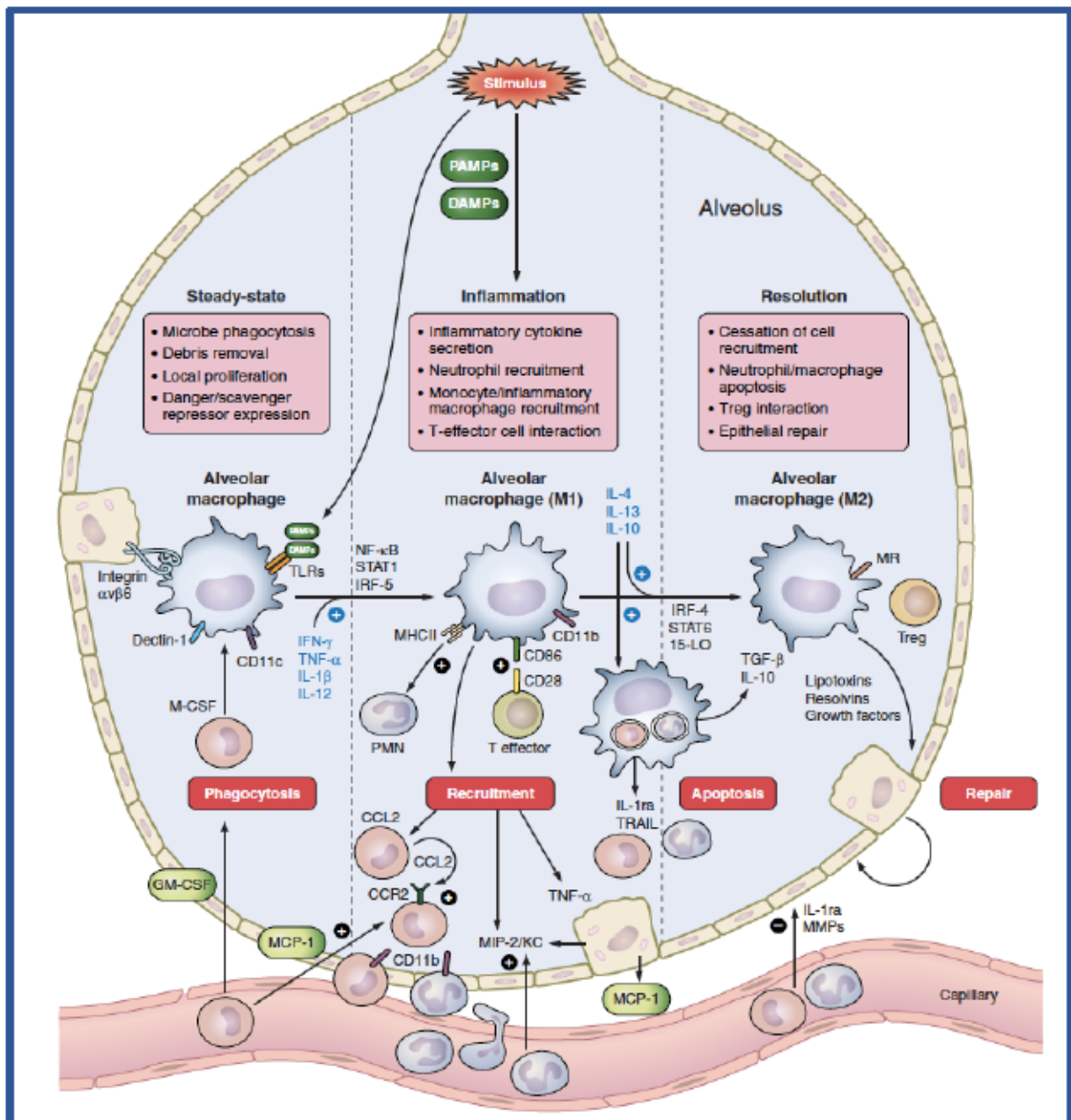
Sur le plan fonctionnel, les monocytes/macrophages alvéolaires sont extrêmement diversifiés, avec des rôles essentiels à la fois dans l'immunité anti-infectieuse pulmonaire et la résilience tissulaire pulmonaire [151]. Dans des conditions homéostatiques normales, les macrophages suppriment l'inflammation par une variété de mécanismes [146]. Dans le cadre d'une infection, cependant, les monocytes/macrophages sont l'objet d'une importante plasticité, passant d'une fonction de ménage anti-inflammatoire à un nœud central d'activité immunitaire. Les macrophages portent un armement de récepteurs de reconnaissance microbiens [153] leur permettant de répondre à un répertoire diversifié d'agents pathogènes. Lors de la reconnaissance de l'agent pathogène, les monocytes/macrophages contribuent directement à la résistance immunitaire par l'ingestion et la phagocytose des germes [151]. De concert avec la phagocytose, l'apoptose peut contribuer à la destruction maximale des germes médiée par les macrophages [154]. Celle-ci est une voie spécialisée de résistance immunitaire, tandis que d'autres voies d'apoptose des macrophages sont plutôt préjudiciables à l'hôte. La capacité microbicide directe des monocytes/macrophages est complétée par leur capacité exceptionnelle à coordonner l'activité immunitaire d'autres cellules, à la fois voisines et distantes, ce qui est essentiel lorsque les microbes sont trop virulents ou trop nombreux pour être efficacement contrôlés par l'immunité innée résidente. Pour ce faire, les monocytes/macrophages sécrètent des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF), les interleukines (IL) IL-1 α , l'IL-1 β , des chimiokines, l'IL-6 [155] et le facteur de stimulation des granulocytes (G-CSF), pour activer l'immunité innée pulmonaire [149]. Parce qu'ils expriment des protéines connues pour atténuer la réponse immunitaire aux agressions

et faciliter l'élimination non inflammatoire des cellules et des débris apoptotiques, comme le CD-200 ou le complexe protéine α lié aux protéines de surfactant A et D, de nombreux chercheurs suggèrent que le rôle du macrophage alvéolaire est d'éliminer les agents pathogènes et les particules sans induire de réponse inflammatoire susceptible de perturber les échanges gazeux [146, 156, 157]. Les macrophages alvéolaires libèrent également le facteur de croissance transformant (TGF)- β , qui inhibe les réponses immunitaires en empêchant l'activation médiée par les cellules dendritiques des lymphocytes T effecteurs [147]. De plus, les macrophages alvéolaires expriment plusieurs récepteurs *scavengers* qui se lient au complément, aux molécules libérées en cas d'endommagement tissulaire et cellulaire (DAMP) et celles associées aux pathogènes (PAMP), pour faciliter la clairance des pathogènes [158].

En résumé, pendant la quiescence, les macrophages sont attachés aux cellules épithéliales, avec une expression persistante des récepteurs de reconnaissance de microbes comme les récepteurs Toll-like (TLR) et les récepteurs *scavengers* (Dectin-1). Le renouvellement est lent et est effectué principalement par la prolifération locale induite par le M-CSF/GM-CSF, avec un recrutement minimal à partir des monocytes circulants. Suite à une stimulation par des antigènes étrangers (PAMP, DAMP), se produit l'activation des macrophages, orientant les macrophages résidents vers un état d'activation M1 (facteurs de transcription NF- κ B, STAT1, IRF-5 ; cytokines IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL -12) caractérisé par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires capables de recruter des neutrophiles (MIP-2/KC) et des monocytes/macrophages inflammatoires (MCP-1/CCL2), ainsi que par la stimulation des cellules épithéliales alvéolaires (TNF) et des lymphocytes T effecteurs (CD86-CD28) pour promouvoir et maintenir la réponse immunitaire effectrice. Suite à un contrôle suffisant de l'antigène étranger, les macrophages se reprogramment vers un état d'activation M2 (facteurs de transcription STAT6, STAT3, IRF-4, 15-LO ; cytokines IL-4, IL-13, IL-10) et coordonnent une série de réponses régulées pour abroger l'inflammation et améliorer la résolution et la réparation tissulaire. Les processus clés comprennent alors l'arrêt du recrutement des cellules inflammatoires (IL-1ra, MMP), l'apoptose des cellules inflammatoires (IL-1ra, TRAIL, IL-10, TGF- β), l'interaction avec les lymphocyte T régulateurs (Treg) et la sécrétion de facteurs de croissance qui favorisent la réparation épithéliale et la transition du pneumocyte de type II au

type I. Pour illustrer les différentes fonctions des macrophages selon les différentes étapes de l'inflammation, la **Figure 7** en représente un schéma synthétique [151].

Figure 7. Renouveaulement, polarisation et fonction des monocytes/macrophages alvéolaires. Issue de [151].



Trois principaux états caractérisent la polarisation des macrophages alvéolaires : à l'état d'homéostasie le macrophage alvéolaire est principalement orienté vers la fonction de phagocytose, l'élimination des débris, la prolifération locale et la répression de l'expression des récepteurs dangers/scavengers. Suite à une agression, le macrophage alvéolaire se polarise et oriente son action vers la sécrétion de cytokines inflammatoires, le recrutement des neutrophiles et des monocytes circulants et l'interaction avec les lymphocytes T effecteurs. Enfin, lors de la phase de résolution, le macrophage alvéolaire cesse le recrutement des cellules inflammatoires

et oriente son action vers l'interaction avec les lymphocytes T régulateurs afin de promouvoir la réparation épithéliale. AEC, cellule épithéliale alvéolaire ; CCL2, chimiokine ligand 2 ; CCR2, récepteur 2 de la chimiokine ; GM-CSF, facteur de stimulation des colonies de granulocytes macrophages ; IFN- γ , interféron- γ ; IL, interleukine; IL-1ra, antagoniste des récepteurs de l'interleukine 1 ; iNOS, monoxyde d'azote synthase inductible ; IRF, facteur régulateur de l'interféron ; LO, lipoxigénase; M-CSF, facteur de stimulation des colonies de macrophages ; MCP-1, protéine chimiotactique des monocytes-1 ; MIP-2, protéine inflammatoire des macrophages-2 ; les MMP, les métalloprotéinases matricielles ; MR, récepteur du mannose (MRC1); NF- κ B, facteur nucléaire κ -activateur de chaîne légère des lymphocytes B activés ; PMN, leucocyte polymorphonucléaire (neutrophile); STAT, transducteur de signal et activateur de transcription ; TGF- β , facteur de croissance transformant- β ; TLR, récepteurs de type Toll ; TNF- α , facteur de nécrose tumorale- α ; TRAIL, ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale; Treg, cellule T régulatrices.

Alors que les MA peuvent être les leucocytes résidents exclusifs des espaces aériens, ils ne représentent pas la seule population de macrophages à l'origine de l'immunité innée. En réponse à la stimulation inflammatoire, l'induction de la chimiokine CCL2 agit comme le signal principal pour recruter des monocytes dans les espaces aériens [159, 160], qui sont ensuite activés [161], élargissant le pool de macrophages disponibles. Cette population de monocytes inflammatoires nouvellement recrutés est fonctionnellement similaire aux macrophages résidents activés classiquement (M1), en ce qu'ils sont des phagocytes capables de produire des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF et l'IL-12, et ils peuvent être distingués des cellules résidentes par une variété de marqueurs de surface exprimés de manière différentielle, dont le plus notable est l'expression élevée de CD11b [151]. L'une des autres fonctions des monocytes recrutés est d'augmenter le recrutement d'autres cellules immunitaires comme les neutrophiles [159] ou les lymphocytes innés ILC3 [162]. Ainsi, les monocytes recrutés sont un déterminant clé des défenses innées de l'immunité pulmonaire anti-infectieuse.

Dans le SDRA expérimental, l'épuisement des macrophages montre un effet à un stade précoce, alors qu'il exacerbe les lésions pulmonaires à un stade tardif. Les neutrophiles sont les premiers leucocytes recrutés par les macrophages activés suite à une libération d'IL-8 et de MIP-2 [163–165]. À un stade précoce, la déplétion en macrophages peut atténuer l'alvéolite induite par les neutrophiles en réduisant les réponses inflammatoires. À un stade ultérieur, les monocytes circulants migrent dans les alvéoles en réponse à la chimiokine MCP-1 afin de phagocyter les particules infectées et les débris inflammatoires [151, 166]. À ce stade, le nombre de monocytes recrutés est augmenté et la réduction de ces macrophages résidents peut entraîner une diminution des macrophages phagocytaires et un meilleur contrôle de l'inflammation. Par conséquent, ces deux types de monocytes/macrophages agissent à un

stade précoce ou tardif au cours du processus de SDRA : les macrophages résidents libèrent des cytokines pour recruter des neutrophiles et des monocytes circulants afin de favoriser et de maintenir l'inflammation, et les monocytes recrutés fonctionnent principalement pour éliminer les agents pathogène.

2.3.2. Les autres acteurs de l'immunité innée et l'épithélium pulmonaire

Cellules épithéliales pulmonaires

L'épithélium pulmonaire est un réseau complexe de sous-ensembles épithéliaux répartis de manière différentielle dans les voies respiratoires supérieures et inférieures [167]. Dans les alvéoles, les protéines du surfactant (SP) A et D, synthétisées par les cellules épithéliales alvéolaires de type II, ont des rôles majeurs dans l'immunité anti-infectieuse, en inhibant directement les agents infectieux [168] et en modulant les activités immunitaires [169]. Elles expriment à leur surface un large éventail de récepteurs de l'immunité innée, tels que les TLRs ou RAGE [167]. Les cellules épithéliales pulmonaires peuvent être activées par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF [170] mais aussi par d'autres cytokines notamment l'IL-22 et l'IL-17, produites par les lymphocytes T CD4+ Th17 [171] et les lymphocytes innés [172]. L'IL-22 entraîne la synthèse du peptide antimicrobien lipocaline-2 par l'épithélium [173] alors que l'IL-17 induit la sécrétion de la chimiokine CXCL-5 permettant un afflux de neutrophiles au site de l'infection [174]. L'épithélium peut également interagir avec les neutrophiles en sécrétant du GM-CSF [168, 175]. La capacité des cellules épithéliales à contrôler la réponse immune pulmonaire est illustrée par des études montrant que leur activation est hautement protectrice contre les agressions infectieuses ultérieures [176–178]. Ces données mettent en évidence l'importance potentielle de l'exploitation de l'immunité anti-infectieuse fournie par l'épithélium pulmonaire afin de prévenir l'infection pulmonaire [179].

Les cellules lymphocytaires innées (ILC)

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont le pendant inné des lymphocytes T. Les ILCs régulent les réponses immunitaires via la production de cytokines effectrices et influencent ainsi les fonctions d'autres cellules immunitaires innées et adaptatives [180]. Ces cellules sont

particulièrement abondantes dans la muqueuse du poumon. Il existe trois grands groupes d'ILC, à savoir les ILC1, les ILC2 et les ILC3. La classification des ILC reflète la capacité de ces cellules à sécréter des cytokines de types 1, 2 et 17, respectivement. Des rôles bénéfiques pour les ILC1 et les ILC2 ont été rapportés dans des modèles de pneumonie virale [181, 182]. Les ILC3 pulmonaires ont un rôle protecteur dans la pneumonie en sécrétant l'IL-17 et l'IL-22 [162, 172] ainsi que dans la réparation tissulaire [172].

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) et les monocytes/macrophages orchestrent la réponse immunitaire anti-infectieuse. Les réponses immunitaires aux agents infectieux sont initiées et contrôlées par diverses populations de cellules présentatrices d'antigènes dotées de fonctions spécialisées, notamment les DC conventionnelles (cDC), les DC dérivées de monocytes (moDC), les DC plasmacytoïdes (pDC) et les macrophages alvéolaires. [183, 184]. De plus, lors de l'inflammation pulmonaire, les DC dérivées des monocytes (moDC) ont été décrites peuplant le poumon. Les infections virales respiratoires représentent un bon exemple de réponses inflammatoires pulmonaires où les fonctions spécialisées des sous-ensembles de DC peuvent être appréciées. Il a été démontré que les DC jouent un rôle important dans l'initiation des réponses antivirales des lymphocytes cytotoxiques TCD8 qui conduisent à la clairance virale [185]. Ceci est particulièrement pertinent dans le cas de l'infection par le virus de la grippe A, où l'intensité de la réponse immunitaire des DC peut considérablement affecter la survie de l'hôte. Les DC jouent aussi un rôle centrale dans la lutte contre les infections pulmonaires bactériennes comme illustré dans la tuberculose pulmonaire [186].

2.3.3. Immunité adaptative

Malgré un système de défense pulmonaire innée complexe et bien structuré, de nombreux agents pathogènes y échappent et nécessitent l'intervention du système immunitaire adaptatif humoral et cellulaire pour un contrôle ultime de l'infection.

L'importance de l'immunité humorale dans la défense anti-infectieuse pulmonaire n'est plus à démontrer. L'un des premiers traitements efficaces contre la pneumonie, utilisé jusqu'à ce que les antibiotiques soient disponibles, était la «thérapie sérique», dans laquelle des

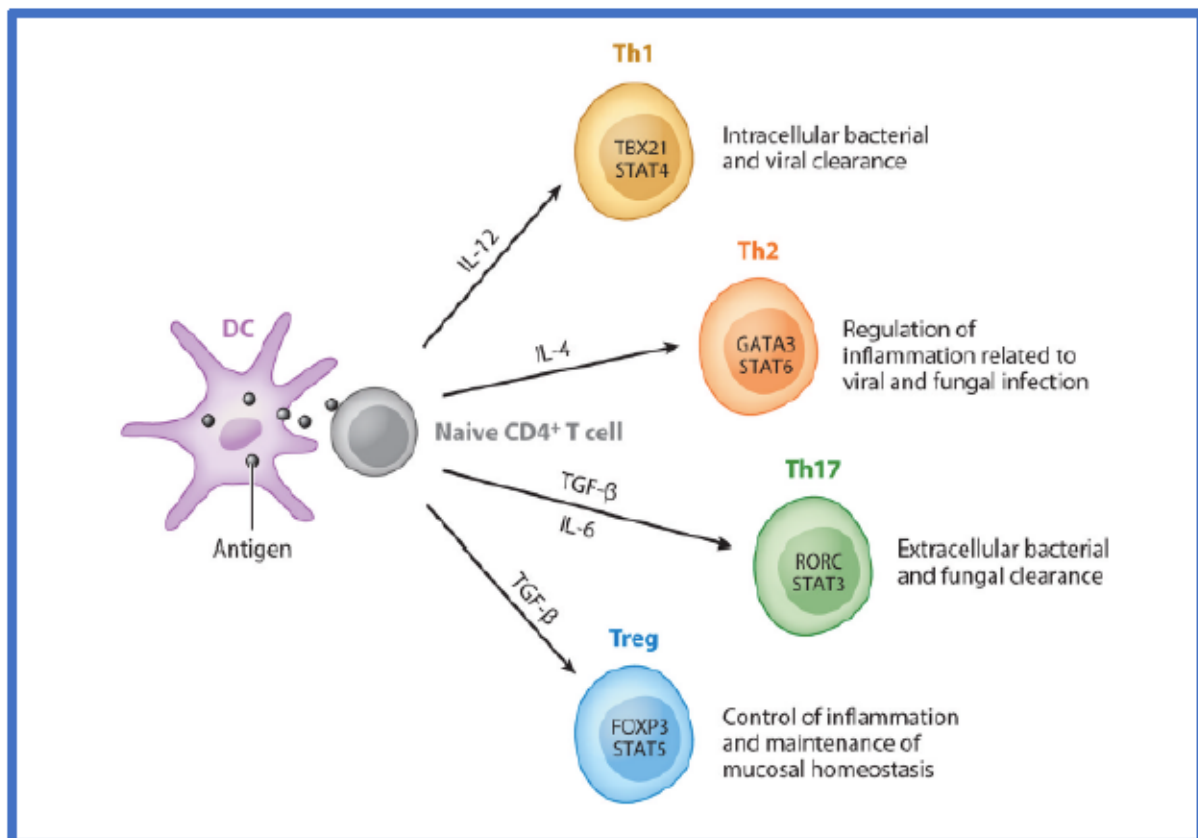
anticorps, prélevés sur des chevaux ou des lapins qui avaient été exposés en série à des infections à pneumocoque, étaient administrés à des patients atteints de pneumonie [187, 188]. Les vaccins contre la grippe, le pneumocoque et l'*Haemophilus influenzae* incitent l'hôte à générer ses propres anticorps circulants contre ces agents infectieux, ce qui réduit le risque de pneumonie [189, 190]. Plus récemment, l'utilisation de la plasmathérapie en traitement de sauvetage dans le SDRA à SARS-CoV-2 a permis d'améliorer la survie globale des patients immunodéprimés [191].

Les lymphocytes T jouent un rôle essentiel dans le système immunitaire adaptatif cellulaire : les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires aident les lymphocytes B à produire des anticorps autres que des IgM, fournissent une rétroaction aux cellules dendritiques via des molécules co-stimulatrices et des cytokines, améliorent et maintiennent les réponses des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ ont une activité effectrice directe, incluant l'exécution de fonctions cytotoxiques [192], la médiation de l'activation des macrophages et l'induction de gènes des cellules épithéliales qui contribuent à la défense de l'hôte. Les lymphocytes T CD8⁺ contribuent à la production de cytokines et, plus important encore, tuent directement les cellules infectées par les virus. Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ peuvent former une mémoire immunologique bénéfique à l'hôte lorsque celui-ci est confronté à une provocation secondaire par le même agent pathogène ou des agents pathogènes apparentés.

Les cellules T CD4⁺ constituent un sous-ensemble majeur de cellules T qui jouent un rôle central dans la fonction du système immunitaire lorsque les cellules T CD4⁺ naïves se différencient en cellules effectrices et/ou mémoire après avoir rencontré leur antigène apparenté via des cellules présentatrices d'antigène (APC). Les phénotypes des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs diffèrent selon les conditions de stimulation et peuvent être classés en différentes lignées. Dans les poumons, les cellules dendritiques font le pont entre l'immunité innée et adaptative et, selon le contexte, elles induisent également diverses réponses des lymphocytes T CD4⁺ aux agents infectieux. L'activation des lymphocytes T est initiée dans le poumon après que les DC pulmonaires ou les macrophages alvéolaires phagocytent l'antigène et le présentent aux T CD4⁺ via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et peuvent ainsi initier différentes réponses des lymphocytes T. Le meilleur exemple du rôle central des T CD4⁺ dans la défense anti-infectieuse pulmonaire est démontré par l'infection

VIH. Le VIH cible les lymphocytes T CD4+, faisant évoluer le patient vers la maladie SIDA, définie soit par un nombre de lymphocytes T CD4+ inférieur à 200 cellules/ μ L, soit par la survenue de maladies spécifiques associées à une infection par le VIH, dont la plupart sont des infections pulmonaires, notamment la pneumonie à *Pneumocystis jiroveci*, la tuberculose pulmonaire, la candidose pulmonaire, l'histoplasmosse ou la pneumonie bactérienne récurrente [193]. Plusieurs sous-populations lymphocytaires issues des T CD4+ jouent des rôles distincts dans les défenses anti-infectieuses pulmonaires (**Figure 8**). Les lymphocytes T CD4+ naïfs se différencient en cellules Th1, Th2, Th17 ou Treg après une rencontre avec l'antigène présentée par les APC, suivie d'une spécification de lignée contrôlée par certains environnements de cytokines (IL-12, IL-4, TGF- β /IL-6, ou TGF- β , respectivement) qui régulent l'expression des facteurs de transcription spécifiques à la lignée (représentés dans les cellules de la lignée T *helper* respectives). Ces lymphocytes T effecteurs jouent un rôle essentiel dans la médiation de la défense pulmonaire de l'hôte.

Figure 8. Sous-populations des lymphocytes T CD4+ dans les défenses anti-infectieuses pulmonaires. Issue de [194].



Les principaux sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ dans la défense pulmonaire de l'hôte : les lymphocytes T CD4+ naïfs se différencient en cellules Th1, Th2, Th17 et Treg après une rencontre avec l'antigène présentée par les DC suivie d'une spécification de lignée contrôlée par certains environnements de cytokines (IL-12, IL-4, TGFβ/IL-6 ou TGF-β, respectivement) qui régulent l'expression des facteurs de transcription spécifiques à la lignée (représentés dans les cellules de la lignée T *helper* respectives). Ces lymphocytes T effecteurs jouent un rôle essentiel dans la médiation de la défense pulmonaire de l'hôte : Th1 spécialisées dans la défense contre les bactéries intracellulaires et les virus, les Th2 dans la régulation de l'inflammation induite par les infections virales et fongiques, les Th17 dans la défense contre les parasites et les bactéries extracellulaires et les Treg dans le contrôle de l'inflammation et la maintenance de l'homéostasie des muqueuses. DC : cellules dendritiques ; IL-12/4/6 : interleukines-12/4/6 ; Natives CD4+ T cells : lymphocytes TCD4+ ; Th1/2/17 : lymphocytes T *helper* 1/2/17 ; Treg : lymphocyte T régulateurs ; TGF-β : *transforming growth factor*-β .

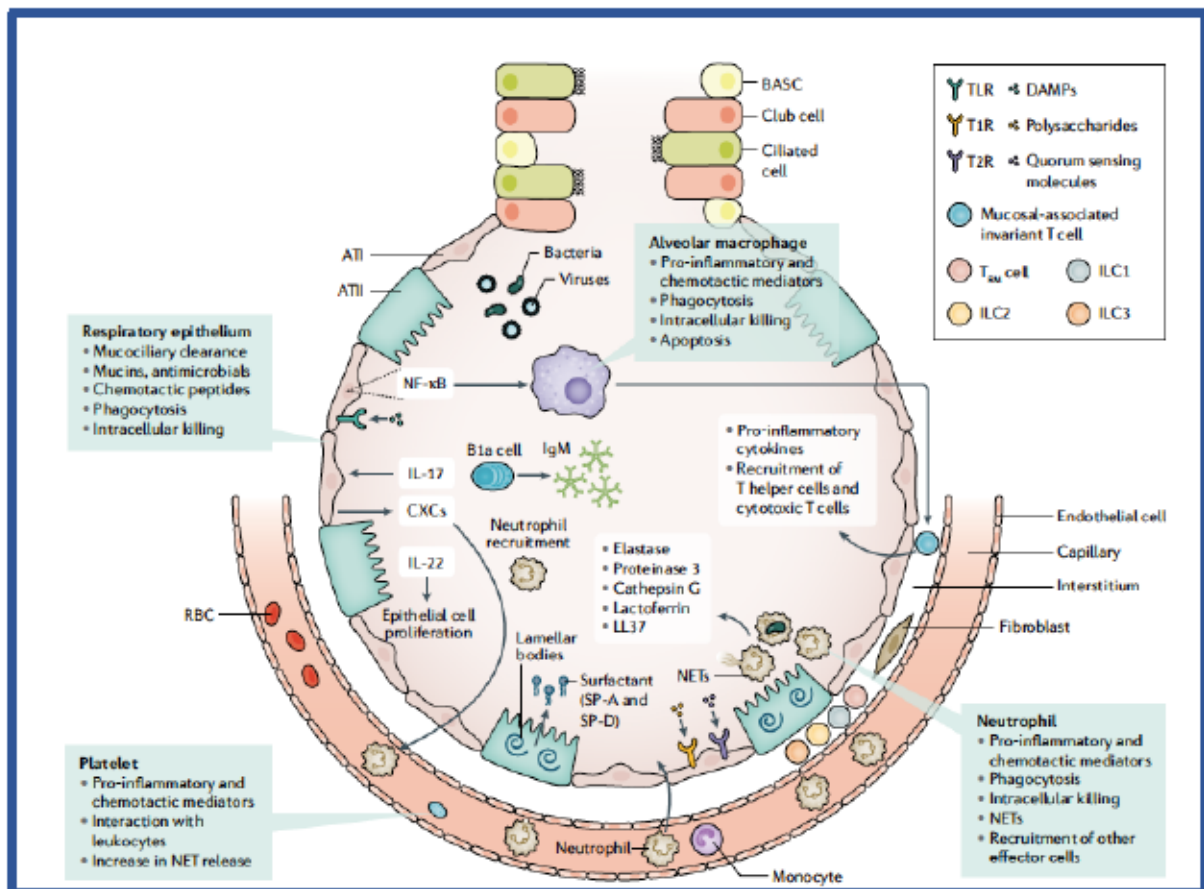
Les lymphocytes T CD8+ sont des lymphocytes T cytotoxiques producteurs d'IFN-γ, de TNF-α et d'IL-2. Après l'infection grippale, la réponse des lymphocytes T CD8+ spécifiques aux épitopes dominants dans les poumons se produit après l'infection ou l'immunisation et est essentielle à l'élimination du virus [195]. Cependant, la libération de molécules cytotoxiques (par exemple, granzyme et perforine) et de cytokines antivirales (par exemple, TNF et IFN-γ) peut contribuer à la pathologie pulmonaire [196]. Le rôle protecteur que jouent les lymphocytes T CD8+ dans l'immunité contre *Mycobacterium tuberculosis* a également été bien

identifié. Les lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène reconnaissent et lysent les cellules infectées par *M. tuberculosis* et produisent des cytokines telles que le TNF et l'IFN- γ , essentielles à l'activation des macrophages [197]. L'absence d'activation de la population de lymphocytes T CD8+ mémoires protectrice chez les souris TLR3-/- est associée à une plus grande susceptibilité à l'aspergillose pulmonaire [198], suggérant un rôle protecteur des lymphocytes T CD8+ dans l'immunité antifongique pulmonaire. Les lymphocytes T CD8+ sont également recrutés en grand nombre dans les poumons en réponse à une infection à *Pneumocystis*, et ils sont associés à un certain niveau de défense de l'hôte [199] ainsi qu'à des lésions pulmonaires [200].

Les lymphocytes T invariants (iNKT), les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes invariants associés aux muqueuses sont d'autres lymphocytes T de type inné présents dans la muqueuse pulmonaire [201]. Ces cellules jouent probablement un rôle dans l'immunité protectrice lors d'une infection des voies respiratoires par le biais de divers mécanismes, notamment la production de cytokines pro-inflammatoires, l'activation des macrophages et le recrutement d'auxiliaires effecteurs et de lymphocytes T cytotoxiques [202].

Ainsi, la survenue d'une pneumonie modifie profondément l'environnement immunitaire pulmonaire (**Figure 9**). Toutefois, il a été mis en évidence une grande variabilité dans les profils de réponse immunitaire pulmonaire anti-infectieuse, en particulier dans la pneumonie compliquée de choc septique.

Figure 9. L'immunité anti-infectieuse pulmonaire. Issue de [203].



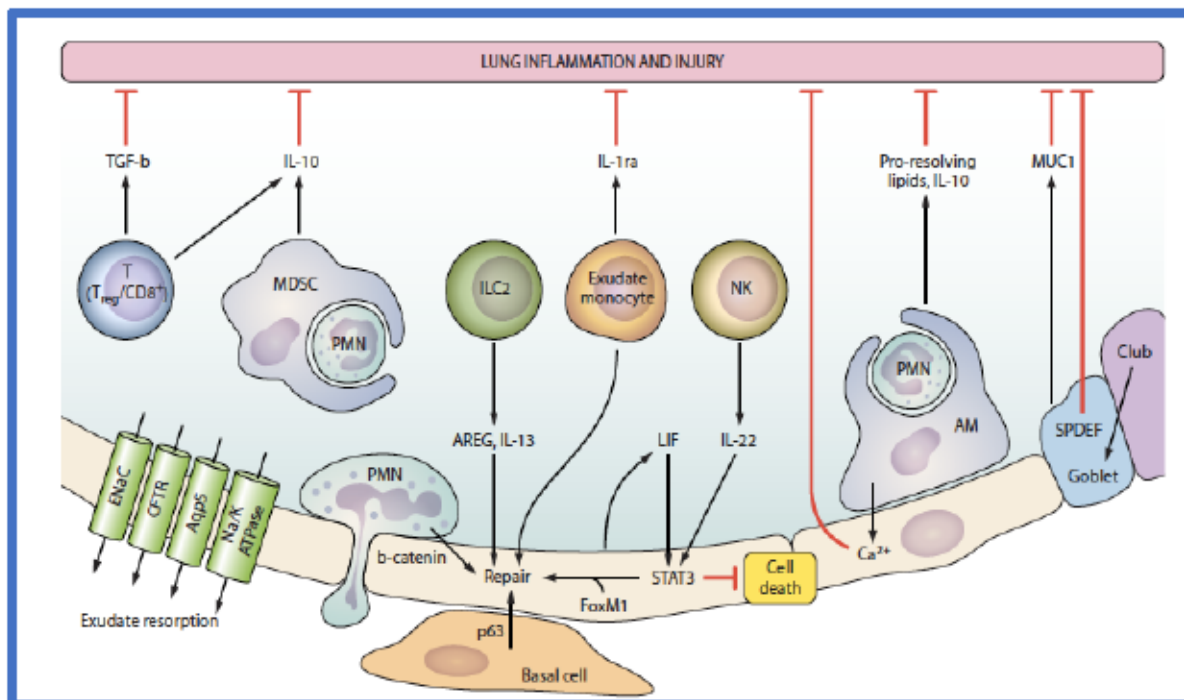
La réparation des tissus contrôle l'inflammation excessive tout en préservant la protection contre les agents pathogènes. L'épithélium respiratoire est un acteur important de la réparation tissulaire. Le maintien de l'intégrité structurelle de la barrière épithéliale est ici un facteur crucial. Les macrophages alvéolaires ont également un rôle important, via la libération de médiateurs anti-inflammatoires et l'efférocytose (phagocytose des leucocytes apoptotiques). Les macrophages sessiles adhèrent à l'épithélium, où ils contribuent probablement à la réparation des tissus. Les types de cellules recrutées sur le site de l'infection pendant la pneumonie qui sont impliquées dans la réparation des tissus comprennent les cellules suppressives myéloïdes, les cellules T régulatrices (Treg), les ILC2 de type 2 et les cellules tueuses naturelles (NK). ATI : cellule alvéolaire de type I ; ATII : cellule alvéolaire de type II ; BASC : cellule souche bronchioalvéolaire ; les CXCs : les chimiokines ; DAMP : motifs moléculaires associés aux dommages ; NF- κ B : facteur nucléaire- κ B ; GR : globule rouge ; SP : protéine du surfactant ; T1R : récepteur du goût sucré couplé aux protéines G ; T2R : récepteur du goût amer couplé aux protéines G ; TLR : récepteur de type Toll.

2.3.4. La réparation tissulaire

La réparation des tissus pulmonaires est essentielle pour contrôler une inflammation excessive tout en maintenant une protection efficace contre les agents infectieux. Les macrophages alvéolaires contribuent à la résilience des tissus en produisant des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et l'antagoniste des récepteurs de l'IL-1, et par la phagocytose des leucocytes apoptotiques. Ce processus est appelé efférocytose et protège les tissus de deux manières : en empêchant la libération de contenus pro-inflammatoires et

toxiques par les cellules mourantes et en provoquant simultanément la libération de facteurs anti-inflammatoires et de réparation, notamment le TGF- β 1, la prostaglandine E2 et des médiateurs lipidiques pro-résolution [204]. Les médiateurs lipidiques réparateurs (résolvines, protectines et marésines) peuvent induire une grande variété de réponses immunitaires dans la pneumonie, à la fois en augmentant la destruction bactérienne et en favorisant la réparation tissulaire [205]. Il a été démontré que ces médiateurs ont des rôles protecteurs importants dans des modèles murins de pneumonie bactérienne [206]. Plusieurs cellules immunitaires recrutées sur le site de l'infection lors d'une infection pulmonaire sont connues pour contribuer à la réparation des tissus, notamment les *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) [207], les cellules T régulatrices [18], les ILC2s [208] et les lymphocytes *natural killer* (NK) [209] (**Figure 10**).

Figure 10. La réparation tissulaire pulmonaire post infectieuse. Issue de [137].



Les principales cellules impliquées dans le contrôle de l'inflammation sont des cellules immunitaires comme les lymphocytes Treg via le TGF- β et l'IL-10, les MDSC via l'IL-10, les monocytes via l'IL-1ra, les macrophages alvéolaires via les médiateurs lipidiques réparateurs ainsi que des cellules épithéliales telles que les cellules cuboïdes et les cellules caliciformes. Les ILC2 via IL-13 et amphiréguline, les cellules NK via l'IL-22, les neutrophiles via la b-caténine et les cellules basales sont impliqués dans la réparation tissulaire. AM : macrophages alvéolaires ; AREG : amphiréguline ; IL : interleukine ; ILC2 : cellule lymphoïde innée de type 2 ; MDSC : cellules myéloïdes suppressives ; MUC1 : mucine-1 ; NK : lymphocyte *natural killer* ; PMN : polymorphonucléaires (neutrophiles) ; SPDEF : SAM-pointed domain-containing Ets-like factor ; T CD8/reg : lymphocytes T CD8+/ régulateurs ; TGF- β : transforming growth factor- β .

3. Sepsis, choc septique et immunodépression post-septique

Le sepsis est défini comme un dysfonctionnement organique potentiellement mortel causé par une réponse dérégulée de l'hôte à l'infection [210]. Bien que l'incidence précise de du sepsis soit inconnue, les estimations indiquent qu'il s'agit de l'une des principales causes de mortalité dans le monde [211]. Une population vieillissante, à l'immunité affaiblie par l'immunosénescence [212], l'utilisation croissante d'agents immunomodulateurs concourent à augmenter la vulnérabilité au risque infectieux.

La réponse immunitaire de l'hôte au cours du sepsis implique une physiopathologie complexe et est maintenant reconnue comme consistant à la fois en des mécanismes pro- et anti-inflammatoires [213, 214]. L'infection déclenche une réponse inflammatoire initiale de l'hôte qui peut être excessive et associée à des lésions tissulaires, un dysfonctionnement des cellules endothéliales, et une défaillance d'organes [213, 214]. L'intensité de la réponse hyperinflammatoire est variable et dépend de facteurs tels que les comorbidités du patient, l'état nutritionnel, la charge en micro-organismes et la virulence de l'agent infectieux en cause [214]. Une réponse anti-inflammatoire concomitante, bien que moins évidente, peut être caractérisée par un dysfonctionnement métabolique des leucocytes, des modifications de l'expression génique affectant la fonction des cellules immunitaires, une anergie cellulaire ou l'apoptose. De plus, la persistance du milieu anti-inflammatoire favorise une immunosuppression soutenue, associée à une susceptibilité aux infections qui augmentent *in fine* la morbidité et la mortalité [215, 216].

3.1. Choc septique : la conséquence d'une réponse inflammatoire excessive de l'hôte

Après l'infection, l'agent pathogène envahissant rencontre le système immunitaire inné de l'hôte. Les cellules innées « détectent » les agents pathogènes en reconnaissant les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) grâce à un assortiment de récepteurs (PRR) [217]. Dans la plupart des cas, la réponse immunitaire innée élimine l'agent pathogène infectant. Chez les patients admis à l'hôpital avec un sepsis, le système immunitaire s'est écarté de l'homéostasie dans deux directions opposées en montrant à la fois des signes

d'inflammation excessive et des signes d'immunosuppression dont l'ampleur varie d'un individu à l'autre.

Les PRR interagissent avec divers PAMP et DAMP, et cette diversité peut probablement expliquer la similitude entre les réactions inflammatoires induites par différents agents pathogènes et celles provoquées par différents types de lésions, infectieuses ou non infectieuses [218, 219]. Les cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la pathogenèse du sepsis comprennent le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'IL-1 β , l'IL-12 et l'IL-18. Le blocage ou l'élimination de ces cytokines confère une protection dans des modèles animaux d'infection aiguë fulminante [220]. Bien que la pertinence de ces résultats expérimentaux pour le sepsis humain soit discutable, la mortalité précoce dans le sepsis - qui est généralement due à un collapsus cardiovasculaire et à des défaillances de plusieurs organes - est associée à une réaction inflammatoire excessive. Les réponses inflammatoires caractéristiques du sepsis comprennent l'activation du système du complément, du système de coagulation et de l'endothélium vasculaire, dont les fonctions sont étroitement interconnectées et régulées de manière croisée [214].

L'activation du complément entraîne la libération de petits fragments d'activation connus sous le nom d'anaphylatoxines, en particulier C3a et C5a, qui ont de puissants effets pro-inflammatoires, notamment le recrutement et l'activation des leucocytes, des cellules endothéliales et des plaquettes [221]. Bien que l'activation du complément soit une composante essentielle de l'immunité protectrice, l'activation incontrôlée du complément peut causer des dommages tissulaires et des défaillances d'organes. Le blocage de la signalisation C5a a amélioré le pronostic du sepsis expérimentale dans plusieurs modèles animaux [222]. Les récepteurs de C3a et C5a peuvent avoir des rôles différents dans le sepsis, comme l'indique une étude dans laquelle un traitement avec un antagoniste des récepteurs C5a améliorait la survie au cours d'un sepsis polymicrobien, tandis que l'administration d'un antagoniste des récepteurs C3a réduisait la survie [223].

Le sepsis est aussi associé à une forte activation du système de coagulation, pouvant être responsable d'une coagulation intravasculaire disséminée, cliniquement associée à une thrombose microvasculaire et à une hémorragie. Cette dernière est due à la consommation de facteurs de coagulation et de plaquettes. Le facteur tissulaire est le principal moteur de l'activation de la coagulation dans le sepsis [224]. La tendance à la thrombose au cours du

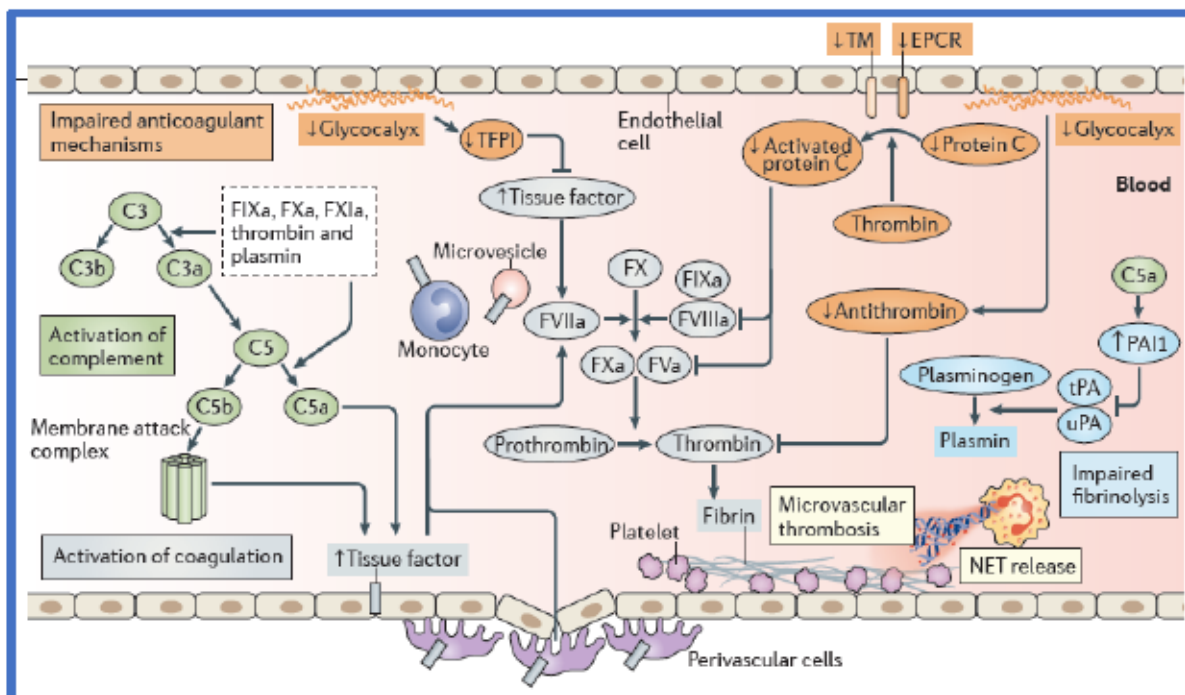
sepsis est augmentée par l'activité simultanément compromise des trois principales voies anticoagulantes : l'antithrombine, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et le système de la protéine C [224]. Considérant que les fonctions de l'antithrombine, du *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) et du système de la protéine C sont altérés dans le sepsis, il existe une justification théorique pour substituer ces voies anticoagulantes dans le traitement du sepsis. Cependant, les essais cliniques évaluant l'antithrombine, le TFPI recombinant ou la protéine C activée recombinante n'ont pas réussi à démontrer un effet bénéfique constant sur la mortalité liée au sepsis [225–227].

L'inflammation vasculaire et la coagulation sont augmentées par la libération des NETs libérés par les neutrophiles [128]. Il a été suggérée que la NETose ne se produit qu'à un certain seuil de stimulation immunitaire qui peut activer les plaquettes [228]. Les NETs peuvent également contribuer aux lésions tissulaires et à la thrombose. Les patients atteints de sepsis ont des niveaux élevés de NETs dans le sang et cette caractéristique est associée à la défaillance multiviscérale [229]. Les NETs peuvent faciliter la coagulation et la formation de thrombus en servant d'échafaudage pour le piégeage et l'agrégation des plaquettes et des érythrocytes, une fonction médiée par la liaison des NETs à des protéines telles que le fibrinogène, la fibronectine et le facteur Von Willebrand (**Figure 11**).

La rupture de l'intégrité de la barrière endothéliale est un phénomène clé dans la pathogenèse du sepsis. En réponse à une infection localisée, les leucocytes et les plaquettes adhèrent à la surface endothéliale et migrent vers les sites où les bactéries se multiplient. Dans le sepsis, une inflammation exagérée augmente ces processus, contribuant ainsi à l'incompétence de la barrière endothéliale. Une perte d'intégrité de la barrière endothéliale provoque la fuite de protéines intravasculaires et de plasma dans l'espace extravasculaire, un œdème tissulaire et une perfusion microvasculaire réduite. La sphingosine-1-phosphate (S1P) est l'un des médiateurs les mieux étudiés impliqués dans les fuites vasculaires [230]. Un autre acteur du maintien de l'intégrité vasculaire est l'angiopoïétine 1, qui active le récepteur TIE2 (récepteur de l'angiopoïétine 1). L'angiopoïétine 2 est un antagoniste fonctionnel de l'angiopoïétine 1 qui peut perturber la fonction de barrière endothéliale, et son taux plasmatique est un facteur prédictif indépendant de dysfonctionnement d'organe et de décès au cours d'un sepsis [231]. Un rapport plasmatique élevé angiopoïétine 2/angiopoïétine 1 peut être un biomarqueur utile du dysfonctionnement de la barrière vasculaire dans le sepsis.

Une faible numération plaquettaire est indépendamment associée à la mortalité chez les patients atteints de sepsis [232]. L'activation excessive des plaquettes a été impliquée dans les lésions organiques au cours du sepsis par plusieurs mécanismes, notamment l'augmentation du recrutement des cellules immunitaires et de l'inflammation, la facilitation de la formation de thrombus vaso-occlusifs dans les lits vasculaires capillaires et les effets toxiques cellulaires directs médiés par les microparticules dérivées des plaquettes [233]. Bien que plusieurs agents antiplaquettaires améliorent la survie dans des modèles animaux de sepsis, l'effet des inhibiteurs de la fonction plaquettaire dans le sepsis humaine n'a pas été encore étudié dans des essais cliniques randomisés.

Figure 11. Activation des systèmes de coagulation et du complément au cours du sepsis. Issue de [214].



Le sepsis se traduit par un état procoagulant net dans la microcirculation qui favorise le dépôt de fibrine via au moins trois mécanismes : la génération de thrombine médiée par le facteur tissulaire (gris), des mécanismes anticoagulants endogènes dysfonctionnels (orange) et une élimination altérée de la fibrine due à la suppression du système fibrinolytique (bleu) par des niveaux élevés d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI1), qui inhibe les activités de l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA) et de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA). La coagulation et la fibrinolyse interagissent étroitement avec le système du complément (vert). Le facteur tissulaire entraîne l'activation de la coagulation après l'infection. Le facteur tissulaire se lie et active le facteur VII (FVII), après quoi une cascade de réactions protéolytiques aboutit à la formation de FXa, de thrombine et de fibrine. Les cellules périsvasculaires - telles que les fibroblastes, les péricytes et les cellules épithéliales - expriment le facteur tissulaire de manière constitutive, préservant ainsi l'hémostase et l'intégrité des vaisseaux. Le sepsis s'accompagne d'une lésion vasculaire induite par l'inflammation, qui expose le facteur tissulaire aux facteurs de coagulation sanguine, entraînant la coagulation du sang. Les cellules qui sont en contact étroit avec le sang - telles que les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les monocytes - n'expriment pas de grandes quantités de facteur tissulaire lorsqu'elles sont à

l'état de repos, mais elles peuvent être stimulées à le faire par des produits bactériens et pro-cytokines inflammatoires. En plus de la forme associée aux cellules du facteur tissulaire, il peut résider dans des microvésicules dérivées de leucocytes, de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses vasculaires et de plaquettes. La tendance à la thrombose pendant le sepsis est augmentée par l'activité simultanément compromise des trois principales voies anticoagulantes : l'antithrombine, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et le système de la protéine C. L'antithrombine est le principal inhibiteur de la thrombine et du FXa, tandis que le TFPI est le principal inhibiteur du complexe facteur tissulaire-FVIIa. Les propriétés anticoagulantes de l'antithrombine et du TFPI sont soutenues par le glycocalyx, une couche de glycoprotéine-polysaccharide qui recouvre l'endothélium. Au cours du sepsis, la continuité du glycocalyx endothélial est perturbée, ce qui augmente la perméabilité vasculaire et altère la fonction de l'antithrombine et du TFPI. La protéine C activée est générée à partir de la protéine C à la surface des cellules endothéliales au repos, un processus médié par la liaison de la thrombine à la thrombomoduline (TM) et amplifié par le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR). La protéine C activée inactive protéolytiquement les cofacteurs de coagulation FVa et FVIIIa, inhibant ainsi la coagulation. Au cours du sepsis, le système de la protéine C est altéré en raison de multiples facteurs, notamment la diminution de la synthèse de la protéine C par le foie, l'augmentation de la consommation de la protéine C et l'activation altérée de la protéine C en raison de la diminution de l'expression de la TM par les cellules endothéliales. De multiples interactions existent entre les systèmes de coagulation et du complément. Les protéases de coagulation peuvent activer le système du complément et vice versa. L'inflammation vasculaire et la coagulation sont augmentées par la libération de pièges extracellulaires de neutrophiles (NET) par les neutrophiles. EPCR : Protéine C cellule endothéliale/récepteur protéine C activée ; NET : *neutrophil extracellular traps* ; TM : thrombomoduline ; TFPI : *tissue factor pathway inhibitor* ; PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène ; tPA : activateur tissulaire du plasminogène ; uPA : urokinase activateur du plasminogène.

3.2. Immunodépression post-septique

3.2.1. Mécanismes de l'immunodépression post-septique

Au moment de l'admission à l'hôpital, la plupart des patients atteints de sepsis présentent des signes d'immunodépression, qui se prolongent chez ceux qui nécessitent des soins intensifs. Le terme immunosuppression post-septique se rapporte à différents types de cellules, en particulier, la reprogrammation des monocytes et des macrophages par des modifications épigénétiques, l'apoptose accrue des lymphocytes T et B ainsi que la diminution des biomarqueurs cellulaires activateurs de surface.

Les mécanismes responsables de l'immunodépression induite par le sepsis se situent à plusieurs niveaux : l'apoptose cellulaire, l'autophagie, la tolérance aux endotoxines, les modifications transcriptomiques, les modifications épigénétiques et les altérations métaboliques cellulaires.

Apoptose cellulaire et autophagie

L'apoptose des cellules immunitaires dans le sepsis est particulièrement importante pour les lymphocytes T CD4+, T CD8+ et B, les cellules NK et les cellules dendritiques folliculaires. Une étude post-autopsique de patients décédés d'un sepsis a rapporté un épuisement des populations lymphocytaires T spléniques par rapport aux patients décédés de causes non infectieuses [234]. En outre, les cellules T obtenues à partir de sujets décédés d'un sepsis avaient une surexpression du récepteur inhibiteur PD-1 (PD-1 : *programmed death -1*) [234]. L'apoptose induite par le sepsis se produit à la fois par les voies médiées par les récepteurs PD-1 et par les mitochondries, ce qui suggère que plusieurs stimuli d'apoptose cellulaire sont activés pendant le sepsis. L'importance physiopathologique de l'apoptose accrue dans le sepsis a été documentée dans plusieurs modèles animaux, démontrant une amélioration de la survie grâce à des interventions inhibant l'apoptose [213, 235].

Dans certains cas, l'apoptose cellulaire est influencée par l'autophagie [236, 237]. L'autophagie est un mécanisme physiologique qui permet d'éliminer les composants redondants ou dysfonctionnels. Elle peut être un processus cytoprotecteur et peut également induire la mort cellulaire. Dans le modèle murin de sepsis abdominale (ligature et ponction caecale -CLP), l'apoptose des lymphocytes T est induite, tandis que l'autophagie est diminuée dans les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ spléniques [237, 238]. De plus, les souris présentant des lymphocytes avec une délétion spécifique des gènes Atg5 ou Atg7 - gènes essentiels à l'autophagie - ont une mortalité, un dysfonctionnement immunitaire, une apoptose des lymphocytes T accrue par rapport aux souris témoins [237, 238], et une capacité de libération plus élevée d'IL-10 [237]. Ces résultats suggèrent qu'une autophagie déficiente contribue à l'immunodépression induite par le sepsis.

Le sepsis est également associée à une déplétion des lymphocytes B, en raison d'un soutien insuffisant des lymphocytes T ou d'une apoptose accrue. Les lymphocytes B survivants ont un phénotype épuisé, caractérisé par une diminution de l'expression du CMH II et une augmentation de la production d'IL-10 [239].

Tolérance aux endotoxines

L'exposition à long terme au lipopolysaccharide bactérien (LPS) ou l'injection de doses sublétales de LPS chez les animaux peut induire un état de tolérance qui reprogramme les monocytes/macrophages entraînant une réduction de la production de cytokines inflammatoires *in vitro* et *in vivo* en réponse à une provocation ultérieure avec du LPS ou avec d'autres stimuli inflammatoires [240]. Ce phénomène de tolérance aux endotoxines est un phénomène biologique conservé et important [241]. Les monocytes tolérants aux endotoxines présentent également une capacité phagocytaire accrue couplée à une capacité conservée à tuer les agents pathogènes intériorisés, bien qu'avec des capacités de présentation d'antigène et de chimiotaxie altérés [242, 243]. Les monocytes sanguins issus de patients atteints de sepsis présentent plusieurs caractéristiques de tolérance endotoxinique. Ils montrent ainsi une capacité de production réduite de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-6, l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-12, lors d'une stimulation *ex vivo* par du LPS, par rapport à celle de monocytes issus d'individus sains [244, 245]. Parallèlement, une surexpression de cytokines anti-inflammatoires par les monocytes circulants, telles que l'IL-10, le TGF β et l'IL-1ra, a été rapportée [246, 247]. Alors que la tolérance aux endotoxines a été considérée comme un mécanisme de protection contre le choc septique et l'ischémie, son incidence est associée à des risques élevés d'infections secondaires. Ainsi, dans le sepsis, la mortalité due à une infection secondaire est associée à l'existence d'un état tolérant [245]. De même, dans le SDRA, la tolérance endotoxinique est liée à une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales [248].

Régulation neuro-centrale

Le système nerveux central (SNC) joue un rôle majeur dans l'atténuation de la réponse immunitaire après une inflammation et une infection [249, 250]. Le SNC contrôle l'inflammation par trois voies principales : les voies sympathiques et parasympathiques qui agissent au niveau régional par l'innervation des organes lymphoïdes, et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, qui agit au niveau systémique par la libération des glucocorticoïdes [250]. Les mécanismes centraux qui interviennent dans l'apparition de l'immunosuppression induite par le sepsis ont été explorés dans des modèles murins [251] mais sont encore mal connus. De plus, une complexité supplémentaire dans l'évaluation de ces mécanismes est que

chez les patients atteints de sepsis les agonistes chimiques de ces voies distinctes sont fréquemment utilisés comme thérapies (les stéroïdes et la noradrénaline) [252].

Modifications transcriptomiques

Les leucocytes de patients gravement malades présentent un transcriptome profondément altéré avec 70 à 80% de tous les transcrits d'ARN exprimés différemment par rapport à l'état homéostatique [214]. L'expression de gènes impliqués dans les voies de dysfonctionnement pro-/anti-inflammatoires et mitochondriales est généralement augmentée dans le sepsis, tandis que l'expression de gènes ayant des fonctions dans l'initiation de la traduction, la signalisation de la rapamycine (mTOR), l'immunité adaptative (principalement des lymphocytes T) et la présentation d'antigène est diminuée [214]. Deux signatures distinctes de réponse au sepsis ont été décrites dans l'analyse transcriptomique des leucocytes circulants de patients atteints de pneumonie communautaire grave, dont l'une a identifié des patients avec un phénotype immunodéprimé, comprenant les attributs de la tolérance endotoxinique, l'épuisement des lymphocytes T, la régulation négative de la classe HLA II et une mortalité associée plus élevée à 14 jours de l'admission [253]. De façon surprenante, il a été observé que la majorité des modifications transcriptionnelles des leucocytes circulants était exprimée indépendamment de la source du sepsis (pneumonie communautaire *versus* péritonite fécale) [254].

Une étude récente a utilisé le séquençage d'ARN unicellulaire pour profiler les cellules mononucléaires du sang périphérique et les cellules dendritiques afin de montrer que le sepsis était associée à une expansion d'une population unique de monocytes CD14+, qui présentait des caractéristiques majeures d'immunosuppression (une expression réduite du CMH II, une capacité réduite à activer le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) et à produire du TNF lors d'une stimulation *ex vivo* par du LPS [255]. Cependant, il est important de reconnaître les limites potentielles des données d'expression génique qui ne reflètent pas nécessairement la synthèse protéique en raison des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.

Modifications épigénétiques

La modification épigénétique des cellules immunitaires dans le sepsis a été identifiée comme un mécanisme important par lequel la régulation transcriptionnelle a lieu [214, 256, 257]. Elle peut se produire par l'un des trois mécanismes suivants : méthylation de l'ADN, modification des histones et régulation post-transcriptionnelle par les microARN (miARN) et l'ARN long non codant [240, 256, 258]. Des résultats similaires ont été observés à la fois *in vitro* dans des expériences de tolérance au LPS avec des lignées cellulaires monocytaires humaines et *in vivo*, sur des monocytes de patients atteints de sepsis [259]. Ainsi, la « tempête de cytokines du sepsis » peut diriger la perte de marques épigénétiques activatrices spécifiques au niveau des promoteurs de gènes pro-inflammatoires dans les monocytes et/ou les macrophages. De même, des études sur des cellules dendritiques pulmonaires de souris septiques ont indiqué une diminution de la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 (H3K4 ; une marque permissive à la transcription) et une augmentation de la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27 ; une marque répressive de la transcription) au niveau de la région promotrice du gène IL-12 corrélé à une diminution de la production d'IL-12 en réponse aux stimuli des récepteurs TLR [260]. De plus, des niveaux accrus d'une modification d'histone répressive ont été notés dans les régions promotrices des gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF dans les leucocytes immunotolérants [261]. Dans la réponse immunitaire adaptative, après un sepsis, la méthylation de H3K27 se produit au niveau de la région promotrice du gène de l'IFN- γ dans les cellules T auxiliaires (Th) de type 1 et du gène codant pour la protéine de liaison GATA 3 (GATA3) dans les cellules Th2 [256]. De plus, une augmentation de la modification permissive des histones au niveau du gène *Forkhead box protein 3* (FOXP3), le facteur de transcription des cellules T régulatrices (Treg), peut influencer la différenciation vers un milieu anti-inflammatoire [262]. Ces résultats sont particulièrement importants, compte tenu de la nature persistante de l'immunosuppression après un sepsis, car ces modulations épigénétiques semblent persister longtemps après que le sepsis ait apparemment disparu. Ainsi, des modifications épigénétiques immunosuppressives persistantes dans les générations ultérieures de leucocytes peuvent avoir un impact négatif sur le pronostic en termes de morbidité et de mortalité.

Les altérations métaboliques

Les altérations du métabolisme des cellules immunitaires sont devenues des facteurs importants de l'immunosuppression induite par le sepsis [216, 263, 264]. Le passage métabolique de la phosphorylation oxydative à la glycolyse anaérobie, malgré des niveaux d'oxygène suffisants pour l'oxydation du glucose dans les mitochondries, est connu sous le nom d'effet Warburg. L'effet Warburg a été décrit à l'origine au cours de la prolifération des cellules cancéreuses [265]. Alors que la glycolyse anaérobie est relativement inefficace du point de vue de l'approvisionnement énergétique, ne produisant que deux molécules d'ATP pour chaque molécule de glucose, ce processus permet aux leucocytes de répondre rapidement aux demandes métaboliques nécessaires pour effectuer des fonctions dans un état inflammatoire, telles que l'activation, la signalisation et la prolifération cellulaires. Les monocytes rendus immunotolérants *in vitro* ont non seulement montré une capacité fortement altérée à produire des cytokines pro-inflammatoires après restimulation, mais également à produire moins de lactate par rapport aux cellules non tolérantes, indiquant une capacité défectueuse à produire un effet Warburg [263]. Les monocytes immunotolérants ont également montré des signes de phosphorylation oxydative et de β -oxydation altérées, indiquant une défaillance de toutes les principales voies métaboliques, une condition appelée paralysie immunométabolique. Des anomalies métaboliques similaires ont été retrouvées dans les cellules mononucléées du sang périphérique prélevées chez des patients atteints de sepsis et ont été restaurées après la guérison [263]. Ces défauts étaient associés à une voie mTOR dysfonctionnelle [263].

3.2.2. Altération de l'immunité innée post-septique

Le sepsis altère les fonctions immunitaires innées incluant les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les MDSC et les fonctions immunitaires adaptatives (**Figure 12**).

Les neutrophiles

Une proportion accrue de neutrophiles immatures, identifiés phénotypiquement par leur faible expression de CD10 et de CD16 et leurs fonctions immunosuppressives, est associée

à une augmentation de la mortalité précoce lors d'un sepsis [266]. En général, de profondes altérations des caractéristiques et des fonctions des neutrophiles ont été observées chez les patients au cours de la première semaine suivant le sepsis, notamment une altération de la clairance bactérienne et de la chimiotaxie [267], une diminution de l'activité oxydative [268] et une faible teneur en lactoferrine qui sont associés à un risque accru de décès chez ces patients [269]. Une association similaire a été également observée chez les patients brûlés [270], d'autant que plusieurs études ont rapporté que la fonction altérée des neutrophiles précède la sensibilité des patients aux infections nosocomiales [271]. En conséquence, dans un modèle murin de sepsis, l'accumulation de protéines du groupe à haute mobilité B1 (HMGB1) dans la phase tardive du sepsis participe aux défauts des neutrophiles (perte de l'activité oxydative) et pourrait donc contribuer à une sensibilité accrue aux infections secondaires [272]. De plus, chez les patients et les animaux atteints de sepsis, la surexpression de PD-L1 par les neutrophiles (un ligand du co-récepteur inhibiteur PD-1 des lymphocytes T) est associée à un mauvais pronostic [273]. Cela a aussi été observé chez les patients atteints de la forme grave de la COVID-19, qui en plus d'une augmentation du nombre de neutrophiles circulants avec un ratio neutrophiles/lymphocytes augmenté, indiquant une myélopoïèse d'urgence, est associée à la surexpression de PD-L1, responsable en partie de l'inactivation des lymphocytes T [274]. Cependant, la valeur pronostique de ces altérations n'a été validée dans aucune large cohorte de patients.

Monocytes/macrophages

Les monocytes et les macrophages jouent un rôle important dans l'immunosuppression induite par le sepsis. Les monocytes de patients septiques montrent généralement une capacité réduite à libérer des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 α , l'IL-6 et l'IL-12 après une deuxième activation par des microbes, alors que leur capacité à libérer des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'antagoniste des récepteurs de l'IL 1 (IL-1ra) et l'IL-10 est soit intacte soit, dans certains cas, même augmentée [241, 275]. Pourtant, il a également été observé que la réponse anti-inflammatoire *in vivo* faisant suite à une endotoxémie humaine expérimentale répétée était atténuée après une deuxième provocation par du LPS [276]. Néanmoins, ces changements observés vers un phénotype anti-inflammatoire après exposition au LPS suggèrent une reprogrammation cellulaire des

monocytes dans des conditions septiques [275]. Fait intéressant, le phénotype anti-inflammatoire observé dans la tolérance aux endotoxines a également été observé dans des monocytes spécifiques d'organes, tels que les monocytes pulmonaires dans des modèles de péritonite animale, ou dans des échantillons *post-mortem* de patients décédés d'un sepsis [234, 277–279] et sur des macrophages alvéolaires issus de patients en post-opératoire de chirurgie cardiaque souffrant d'infection pulmonaire nosocomiale [280]. Il convient de noter, cependant, que les macrophages alvéolaires humains ont été activés après exposition *in vivo* au LPS [281], contrastant avec le phénotype immunotolérant des monocytes sanguins après administration intraveineuse de LPS [263]. Une conséquence supplémentaire de la tolérance aux endotoxines sur les monocytes et les macrophages est la diminution de l'expression d'HLA-DR, un récepteur de surface cellulaire utilisé pour la présentation de l'antigène. La faible expression persistante dans le temps d'HLA-DR par les monocytes circulants est bien établie comme substitut de l'immunosuppression induite par le sepsis et corrélée à un mauvais pronostic (>150 articles publiés) [282, 283]. Dans une analyse multivariée, il convient de noter, qu'après ajustement sur les facteurs de confusion cliniques habituels, la diminution de l'expression d'HLA-DR par les monocytes circulants restait un marqueur prédictif indépendant de mortalité et de survenue d'infections nosocomiales après un choc septique [284, 285]. Cela montre que l'anergie des monocytes et l'immunosuppression par extension peuvent contribuer par elles-mêmes à un risque accru d'événements indésirables dans le sepsis. Cela renforce par conséquent l'idée que la récupération immunitaire est un paramètre clé dans l'évolution favorable des patients.

La surexpression de PD-L1 au cours de l'anergie des monocytes dans le sepsis a suscité un récent intérêt. Plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'expression de PD-L1 par les leucocytes chez des patients atteints de choc septique [286–288]. De plus, une analyse multivariée a révélé qu'une expression accrue de PD-L1 par les monocytes est un marqueur prédictif indépendant de la mortalité à J28 après un sepsis [289]. Cette analyse a mis en évidence l'importance des monocytes dans le système immunorégulateur de PD-1 dans les altérations immunitaires induites par le sepsis. De plus, les données d'études sur les MDSC monocytaires (ou MDSC mononucléaires définies comme CD14+ CD15- HLA-DR-) confirment que la réduction largement rapportée de l'expression de HLA-DR par les monocytes est une

caractéristique essentielle de l'anergie des monocytes et est un biomarqueur fiable de l'immunosuppression induite par le sepsis sévère [290].

Puisqu'ils mesurent directement *ex vivo* la capacité d'une population cellulaire à répondre à un défi immunitaire, les tests fonctionnels représentent idéalement la meilleure méthode pour établir la survenue d'une immunosuppression induite par le sepsis. Concernant les monocytes, de nombreux groupes ont décrit la capacité altérée des cellules de patients septiques à libérer des cytokines pro-inflammatoires en réponse à une stimulation avec du LPS, divers agonistes des TLR ou des bactéries entières *in vitro* [245, 291, 292]. En revanche, leur capacité à libérer des molécules anti-inflammatoires a été conservée. Ces tests, basés sur des mesures de cytokines dans le surnageant de culture cellulaire, représentent des méthodes fiables pour évaluer le phénomène de tolérance aux endotoxines [241]. Bien qu'ils ne conviennent pas vraiment au suivi de routine car ils prennent du temps (temps d'incubation + dosage des cytokines), l'un des tests fonctionnels qui mesure la libération de TNF dans le sang total a été utilisé pour stratifier les patients dans un petit essai clinique évaluant le GM-CSF comme traitement immuno-adjurant du sepsis [293]. Jusqu'à ce jour, il n'y pas eu d'étude clinique de grande ampleur utilisant des tests fonctionnels, alors que les résultats préliminaires sont plutôt encourageants. En effet, Fumeaux et al. ont observé que les monocytes septiques étaient caractérisés par un phénotype anti-inflammatoire prédominant (augmentation du rapport intracellulaire IL-10/TNF) [294]. Néanmoins, nous pouvons nous attendre dans un avenir proche à des protocoles standardisés basés sur l'utilisation de sang total et la détection rapide de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux. Cela pourrait constituer une étape majeure dans la surveillance immunitaire de diverses conditions cliniques, y compris le sepsis.

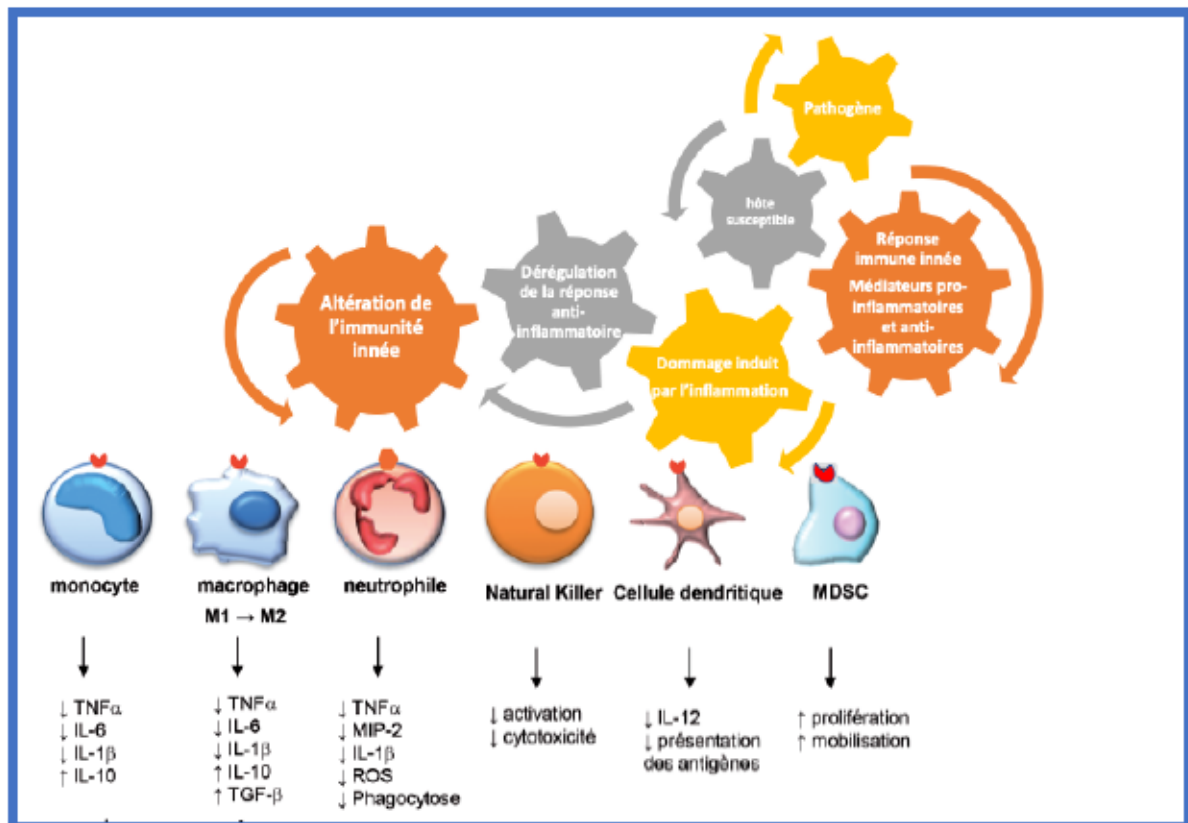
Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et cellules dendritiques (DC)

Une diminution du nombre des DC (rate, sang) et de leurs fonctions a été largement rapportée dans les souris septiques en association avec des altérations globales des fonctions immunitaires [295] et chez l'homme en *post-mortem* après un choc septique [296]. La perte des DC était plus importante chez les patients septiques décédés que chez les survivants [297]. De plus, une diminution profonde et persistante était associée à la survenue d'infections nosocomiales secondaires [298]. Chez les patients septiques, cette diminution du nombre de

DC s'est avérée associée à des altérations phénotypiques : diminution de l'expression des molécules du CMH II, du CD80 et du CD86 [299]. A ce jour, nous manquons encore de données obtenues dans de larges cohortes de patients pour inclure définitivement la diminution des DC dans un panel de surveillance des dysfonctionnements immunitaires induits par le sepsis.

Les MDSC représentent une population mixte de cellules myéloïdes principalement immatures qui répriment les cellules immunitaires effectrices, notamment les cellules T [300]. Les MDSC peuvent inhiber les fonctions immunitaires par plusieurs mécanismes, notamment la privation en L-arginine (essentielle pour les fonctions des cellules T), la stimulation de l'expansion des lymphocytes Treg et la suppression des fonctions des macrophages et des cellules dendritiques [300]. L'expansion des MDSC est également associée à un risque accru d'infections secondaires chez les patients en choc septique [290, 301].

Figure 12. Altération de l'immunité innée au cours du sepsis. Adaptée de [302].



IL-n : interleukine-n ; MDSC : *myeloid derived suppressive cells*; TNF- α : *tumor necrosis factor- α* ; ROS : *reactive oxygen species*.

3.2.3. Altération de l'immunité adaptative post-septique

Une diminution marquée du nombre de lymphocytes circulants a été observée à plusieurs reprises chez des patients après un sepsis sévère [303–306]. Toutes les sous-populations de lymphocytes ont été affectées à l'exception des cellules T régulatrices (Treg) (**Figure 13**). Plus important encore, il a été démontré que l'étendue de cette lymphopénie était corrélée avec le risque de survenue d'une infection nosocomiale ou de décès 28 jours après l'infection initiale [307–311]. Fait important, cette lymphopénie peut durer plusieurs semaines après le début du sepsis et l'absence de sa restauration a été associée à des complications infectieuses retardées [310].

La lymphopénie due à la perte apoptotique est une caractéristique courante des patients septiques [305]. Cependant, les populations de Treg circulants augmentent par rapport aux autres cellules effectrices pendant le sepsis sévère, une tendance qui a été observée dans la

circulation périphérique ainsi que dans les tissus spléniques dans des études animales et humaines [312, 313]. Les raisons du maintien des lymphocytes Treg, qui ont de larges effets régulateurs et suppresseurs sur d'autres cellules immunitaires, peuvent s'expliquer par leur résistance à l'apoptose due à une expression accrue de la protéine anti-apoptotique BCL-2 [295]. Dans les Treg, un phénotype lymphocytaire immunosuppresseur prédomine, caractérisé par une expression accrue d'IL-10. La suppression des réponses immunitaires de type Th1 et des monocytes renforce encore l'environnement anti-inflammatoire, avec une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 β et l'IL-6 [314].

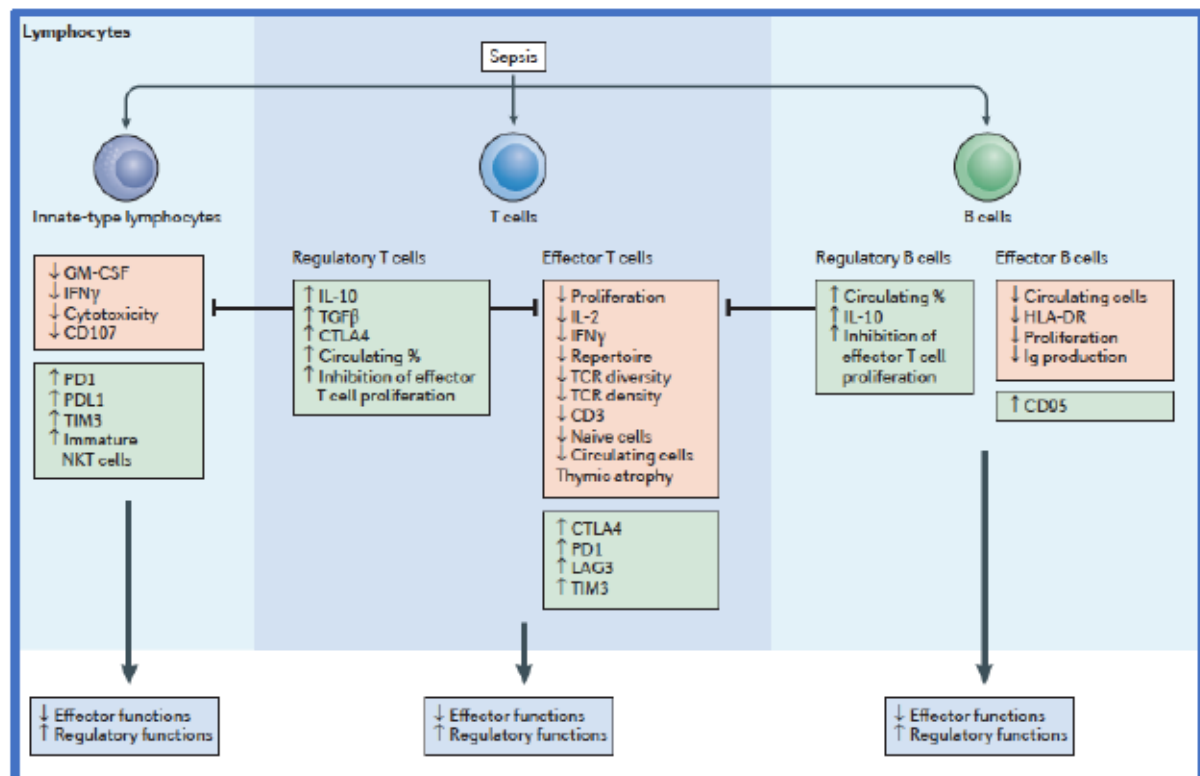
Des études, utilisant à la fois du sang périphérique ainsi que des tissus spléniques et pulmonaires *post-mortem* de patients septiques décédés, ont mis en évidence une production altérée de cytokines par les lymphocytes T [234, 303, 315, 316]. Les facteurs de transcription respectifs pour les lymphocytes de type Th1 et Th2 (T-bet et GATA3), se sont avérés significativement moins exprimés chez les non-survivants par rapport aux témoins sains et par rapport aux survivants septiques jusqu'à 28 jours après le diagnostic de l'infection [317]. La diminution de l'expression de ces facteurs de transcription fournit des éléments qui soutiennent l'existence d'un état anergique parmi les lymphocytes T effecteurs. L'épuisement se manifeste également dans les réponses des lymphocytes T CD8+ sous la forme d'une prolifération cellulaire atténuée, d'une fonction cytotoxique altérée et d'une production atténuée d'IL-2 et d'IFN- γ [295, 318].

Une caractéristique récente et importante de l'anergie lymphocytaire dans le sepsis est la description de la surexpression de divers récepteurs co-inhibiteurs comme PD-1 (CD279), CTLA-4 (CD152) et d'autres (TIM-3 ; BTLA) [234, 319, 320] contribuant à la définition de l'épuisement des lymphocytes T, comme décrit au cours des infections virales chroniques. Concernant PD-1, sa surexpression (ainsi que celle de son ligand, PD-L1) s'est avérée associée à la mortalité et à la survenue d'infections nosocomiales chez les patients en choc septique et était inversement corrélée à la capacité de prolifération lymphocytaire [319]. Ce concept est encore renforcé par des modèles animaux de sepsis dans lesquels l'inhibition de PD-1 par des anticorps ou par délétion du gène ont amélioré la survie [286, 321, 322].

L'épuisement lymphocytaire est un mécanisme sévère et profond qui survient non seulement au niveau systémique mais aussi localement dans les organes après un choc

septique [234]. En effet, Boomer et coll. ont démontré que chez les patients décédés de choc septique, les lymphocytes pulmonaires et spléniques étaient nettement affectés phénotypiquement et fonctionnellement : diminution du nombre de cellules, altération de la réponse fonctionnelle à la stimulation et augmentation de l'expression des récepteurs co-inhibiteurs [234]. Cette surexpression des récepteurs co-inhibiteurs est d'un grand intérêt thérapeutique car elle peut être la cible d'anticorps inhibiteurs (anti-PD-L1 et anti-CTLA-4) modulant ces *checkpoints* immunitaires. La mesure par cytométrie en flux de l'expression de ces récepteurs inhibiteurs pourrait être un précieux outil pour identifier les patients candidats aux thérapies ciblées. Le véritable potentiel de modulation pharmacologique de ces récepteurs nécessite encore de confirmer leur valeur pronostique dans des études observationnelles prospectives sur des cohortes plus larges de patients.

Figure 13. Altération de l'immunité adaptative. Issue de [216].



CTLA4 : protéine 4 (ou antigène 4) associée aux lymphocytes T cytotoxiques ; HLA-DR : antigène leucocytaire humain de classe II- DR ; Ig : immunoglobuline ; GM-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes macrophages ; LAG3 : protéine du gène 3 d'activation des lymphocytes ; NKT : lymphocyte T *natural killer* ; PD1 : *programmed death-1* ; PDL1 : *programmed death ligand-1* ; TCR : récepteur des lymphocytes T ; TGF β : facteur de croissance transformant- β ; TIM3 : récepteur 3 de la mucine de l'immunoglobuline des lymphocytes T.

3.3. Thérapies potentielles de l'immunodépression induite par le sepsis

Malgré l'échec de nombreux essais cliniques, certaines promesses existent probablement encore dans l'utilisation de stratégies de traitements anti-inflammatoires dans les premières heures après l'apparition du sepsis. En effet, des études rétrospectives ont démontré que des sous-groupes de patients atteints de sepsis pourraient bénéficier de stratégies de traitement anti-inflammatoire telles que le blocage des récepteurs de l'IL-1 [323] ou des traitements anti-TNF [324]. Plus récemment, les corticoïdes ont permis de réduire la mortalité liée aux formes sévères de COVID-19 [98]. Cependant, pour éviter des effets potentiellement délétères, les traitements anti-inflammatoires doivent être administrés pendant une courte période après l'admission chez les patients en choc septique car la mortalité est plus souvent tardive et est liée à l'état d'immunosuppression secondaire [325].

Dans ce contexte, l'objectif de la thérapie immunostimulatrice est de restaurer la fonction des cellules immunitaires afin d'éliminer l'infection en cause ou de prévenir voire d'éradiquer les infections secondaires, réduisant ainsi potentiellement la mortalité tardive du choc septique [326]. Les patients atteints de choc septique ont une phase hyper-inflammatoire relativement courte, par conséquent, les médicaments ciblant l'inflammation n'ont que peu de temps pour exercer leurs effets. L'immunosuppression du sepsis fournit ainsi une nouvelle compréhension de la maladie ainsi qu'une nouvelle approche thérapeutique [216]. De ce fait, les chercheurs ont tenté de stimuler les systèmes immunitaires innés et adaptatifs avec l'IFN- γ , le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), le facteur de stimulation des colonies de granulocytes G-CSF, les interleukines 7 et 15 ou la thymosine- α (**Figure 14**). Bien qu'il soit possible que les interventions immunostimulantes exacerbent la phase hyper-inflammatoire du sepsis, les essais cliniques sur l'IFN- γ , un puissant agent immunostimulant, et le GM-CSF, chez des patients présentant divers états inflammatoires systémiques n'ont pas provoqué de réactions inflammatoires incontrôlables. Les résultats les plus convaincants ont été observés dans un essai contrôlé randomisé de 39 patients atteints de choc septique qui avaient des dysfonctionnements immunitaires prouvés (sur la base d'une diminution de l'expression d'HLA-DR par les monocytes circulants) : le traitement par GM-CSF guidé par biomarqueurs chez ces patients n'entraînait pas d'effets indésirables et a effectivement restauré l'immunocompétence des monocytes [327]. De plus, le traitement par GM-CSF a raccourci la durée de la ventilation mécanique et la durée du séjour hospitalière ou en soins intensifs [327]. Le GM-CSF représente donc une potentielle thérapie immunoadjuvante chez les patients atteints de choc septique, bien que des essais contrôlés randomisés de plus grande envergure soient désormais nécessaires pour confirmer ces premiers résultats. Le G-CSF a été utilisé pour augmenter le nombre de polynucléaires neutrophiles dans le but d'améliorer la clairance des agents pathogènes. Cependant, une méta-analyse récente réalisée sur des études concernant le GM-CSF et le G-CSF comme traitement immunostimulant n'a pas réussi à démontrer un bénéfice en termes de survie [328].

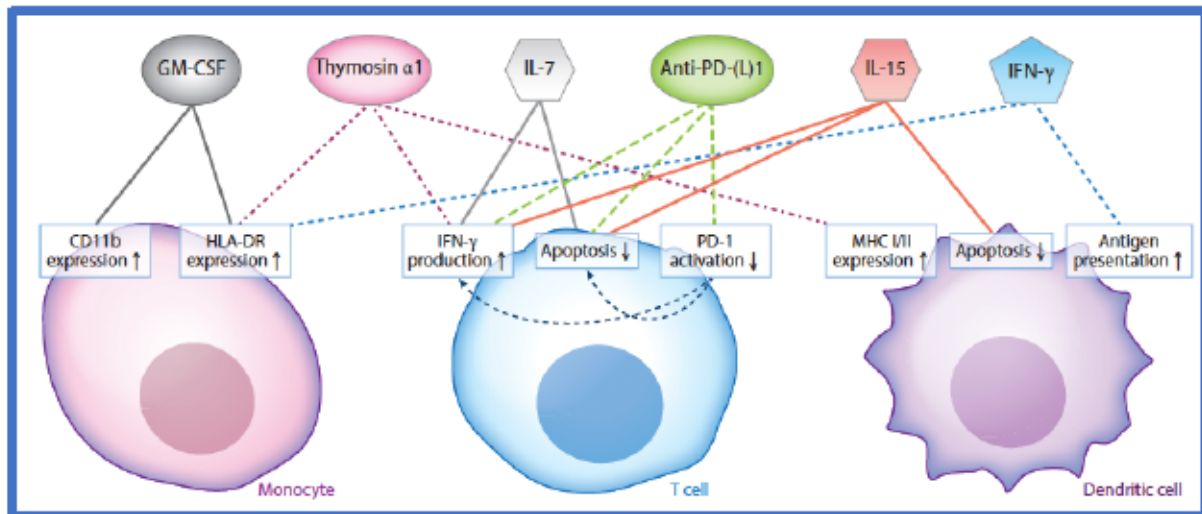
En plus des thérapies sus-citées, les cytokines, telles que l'IL-7 et l'IL-15, peuvent être efficaces pour restaurer l'activité immunitaire des systèmes inné et adaptatif, en ayant une activité immunostimulatrice anti-apoptotique. Inoue et coll. [329] ont rapporté que le

traitement par IL-15 augmentait la survie des lymphocytes, diminuait l'apoptose des cellules NK, des cellules dendritiques et des lymphocytes T et augmentait la sécrétion d'IFN- γ . L'administration d'IL-15 peut avoir des avantages supplémentaires en augmentant la survie des cellules NK et des cellules dendritiques, tandis que l'IL-7 est considérée comme une cytokine qui cible davantage les cellules T. L'IL-7 est une cytokine multifonctionnelle du système immunitaire qui affecte à la fois les lymphocytes T et les lymphocytes B et induit la prolifération des lymphocytes T naïfs et mémoires [330]. Venet et coll., [331] ont démontré que le traitement par l'IL-7 de lymphocytes isolés de patients septiques rétablissait la prolifération des lymphocytes T et leur capacité de sécrétion d'IFN- γ .

La surexpression de PD-1 sur les lymphocytes T ou de son ligand PD-L1 au cours du sepsis en fait une cible thérapeutique privilégiée [287, 332]. Certaines études expérimentales récentes ont démontré que l'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1, soit par suppression génétique, soit par manipulation pharmacologique, améliore la survie dans le sepsis murin bactérien et fongique [286, 322, 333, 334]. L'efficacité des anticorps anti-PD-1 *versus* anti-PD-L1 reste cependant à préciser. À ce jour, aucun essai contrôlé randomisé évaluant les inhibiteurs des checkpoints immunitaires chez les patients atteints de sepsis n'a été publié. Deux études de sécurité clinique (phase Ib) avec un anticorps anti-PD-1 (Nivolumab) [335] et un anticorps anti-PD-L1 [336] publiées récemment confirment leur innocuité et, à des doses plus élevées, l'apparition des signes de restauration immunitaire à J28. D'autres essais randomisés sur l'inhibition de la voie PD-1/PD-L1 sont nécessaires pour évaluer leur sécurité clinique et leur efficacité chez les patients atteints de choc septique.

Différentes stratégies immunostimulantes sont en cours d'évaluation dans le sepsis. La thymosine α 1 semble prometteuse [337], et un essai contrôlé randomisé est en cours [338]. De plus, d'autres thérapies immunoadjuvantes sont à l'étude (IL-15, IL-3, FLT3L, anticorps anti-LAG3, anticorps anti-TIM3, anticorps anti-CTLA4, bloqueurs adrénergiques et anticorps anti-IL-10) [213, 257, 326, 339–342].

Figure 14. Agents immunostimulants pour le traitement de l'immunosuppression induite par le sepsis. Issue de [343].



L'objectif de la thérapie immunostimulatrice est de restaurer la fonction des cellules immunitaires pour traiter soit l'infection qui a causé le sepsis, soit les conditions qui prédisposent à une infection secondaire, réduisant ainsi potentiellement la mortalité tardive dans le sepsis sévère. Plusieurs stratégies de renforcement immunitaire ont été évaluées dans des modèles animaux ou chez des patients atteints de sepsis. Outre la restauration de l'expression du HLA-DR par le monocyte circulant d'autres effets sont observés. La perfusion de GM-CSF entraîne également une augmentation de l'expression de CD11b et de la réponse de cytokine pro-inflammatoire stimulée par le LPS *ex vivo*. La thymosine $\alpha 1$ augmente la production d'IFN- γ à partir des lymphocytes et améliore l'expression du CMH de classe I/II sur les cellules dendritiques. L'IFN- γ augmente la présentation de l'antigène sur les cellules dendritiques, augmentant finalement leurs capacités de destruction des agents pathogènes. Il a été démontré que le traitement par l'IL-7 diminue l'apoptose des lymphocytes T et augmente leur production d'IFN- γ . L'utilisation préclinique de l'IL-15 conduit à une réduction de l'apoptose des cellules dendritiques et des cellules T, tout en augmentant la production d'IFN- γ par les cellules T. Le traitement *ex vivo* des lymphocytes T CD8 + de patients atteints de sepsis sévère par l'inhibiteur du PD-L1 montre une diminution de l'activation et de l'apoptose induite par PD-1 et une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ . GM-CSF, facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages ; HLA-DR, antigène leucocytaire humain-DR ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; IFN- γ , interféron gamma ; IL, interleukine ; LPS, lipopolysaccharide ; PD-1, *programmed cell death- 1* ; PD-L1, *programmed cell death ligand-1*.

4. Variabilité de l'altération immune post-septique et ses biomarqueurs

Certaines infections, notamment les infections pulmonaires peuvent se compliquer d'un choc septique voire d'un syndrome de défaillance multiviscérale. Actuellement, il existe des données robustes qui suggèrent qu'il coexiste à la phase initiale de ce syndrome une réaction pro-inflammatoire mais aussi anti-inflammatoire [213]. Ces données sont basées sur le dosage simultané de cytokines pro- et anti-inflammatoires au niveau du compartiment systémique [344, 345] . Cependant, l'extrapolation des caractéristiques des cellules circulantes aux cellules résidentes des organes peut être source d'erreur, de même que l'évaluation de l'environnement intra-tissulaire des cytokines semble plus difficile car moins accessible.

4.1. Altérations phénotypiques et fonctionnelles des monocytes/macrophages dans la pathogénèse du SDRA

L'accumulation de cytokines pro-inflammatoires et de neutrophiles est impliquée dans la physiopathologie des lésions tissulaires dans le SDRA [129, 346]. Les macrophages M1 servent de promoteur dans le processus de lésion du tissu pulmonaire dans l'ARDS, car ils semblent être la principale source d'IL-1 et de TNF, qui stimulent ensuite les cellules voisines pour propager la réponse inflammatoire caractéristique du SDRA en phase aiguë. Jacobs et coll. [347] ont découvert que l'IL-1 totale et le sous-type IL-1 β étaient sécrétés en quantités accrues par les macrophages alvéolaires issus de patients atteints de SDRA comparativement aux patients atteints de pneumonie sans SDRA ou aux sujets sains. Donnelly et coll. [163] ont noté que l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 dans le LBA et l'augmentation de l'expression de l'IL-8 par les macrophages alvéolaires étaient associées à la progression vers le SDRA chez les patients à risque présentant une inflammation systémique importante. De plus, l'augmentation de l'IL-8 dans le LBA était associée à une mortalité accrue chez les patients atteints de SDRA [22, 348, 349]. Steinberg et coll. [133] ont démontré que chez les patients atteints de SDRA secondaire à un sepsis extra-pulmonaire, une augmentation persistante des neutrophiles alvéolaires et une diminution persistante des macrophages alvéolaires (à la fois en pourcentage des cellules totales du LBA et en nombre absolu) à j7 et j14 étaient associées à un plus mauvais pronostic.

Cependant, un effet protecteur associé aux macrophages M1 a également été observé. Des études récentes ont démontré que ces macrophages génèrent un niveau élevé d'amphiréguline [350, 351], un ligand du récepteur du facteur de croissance épithélial qui protège la barrière épithéliale et inhibe l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires dans un modèle expérimental de lésions pulmonaires aiguës induites par du LPS et par exposition à une ventilation non protectrice [350, 351].

La fibrose pulmonaire, complication tardive du SDRA, est marquée par une prolifération des fibroblastes et un dépôt excessif de matrice extracellulaire [352]. Les cellules de phénotype M2 sont impliquées dans la régulation des réponses fibrotiques dans les poumons [353]. La persistance des macrophages M2 au niveau des lésions est une caractéristique du

développement de la fibrose, et l'expression constante de l'IL-4 et de l'IL-13 peut favoriser le dépôt de collagène par les voies du TGF- β et de l'arginase 1 [354, 355]. En résumé, les macrophages sont paradoxalement impliqués à la fois dans la génération de la fibrose pulmonaire et dans le processus de cicatrisation ultérieur [356]. Ils régulent le recrutement, la croissance et le remodelage des tissus conjonctifs des fibroblastes. De plus, ils contribuent à l'élimination des tissus morts, à la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins et à la dissolution de la fibrine [357]. Le mécanisme de régulation de l'équilibre des régulateurs positifs et négatifs sur les fonctions profibrotiques des macrophages nécessite d'être clarifié.

À l'exception du travail de Roquilly et coll. [358], le rôle et l'altération immune post-SDRA septique des monocytes recrutés et des macrophages résidents ont été très peu évalués dans le SDRA infectieux humain, dont l'étude est aussi limitée par la distinction précise entre ces deux populations.

4.2. Le concept de compartimentalisation alvéolaire de la réponse immune

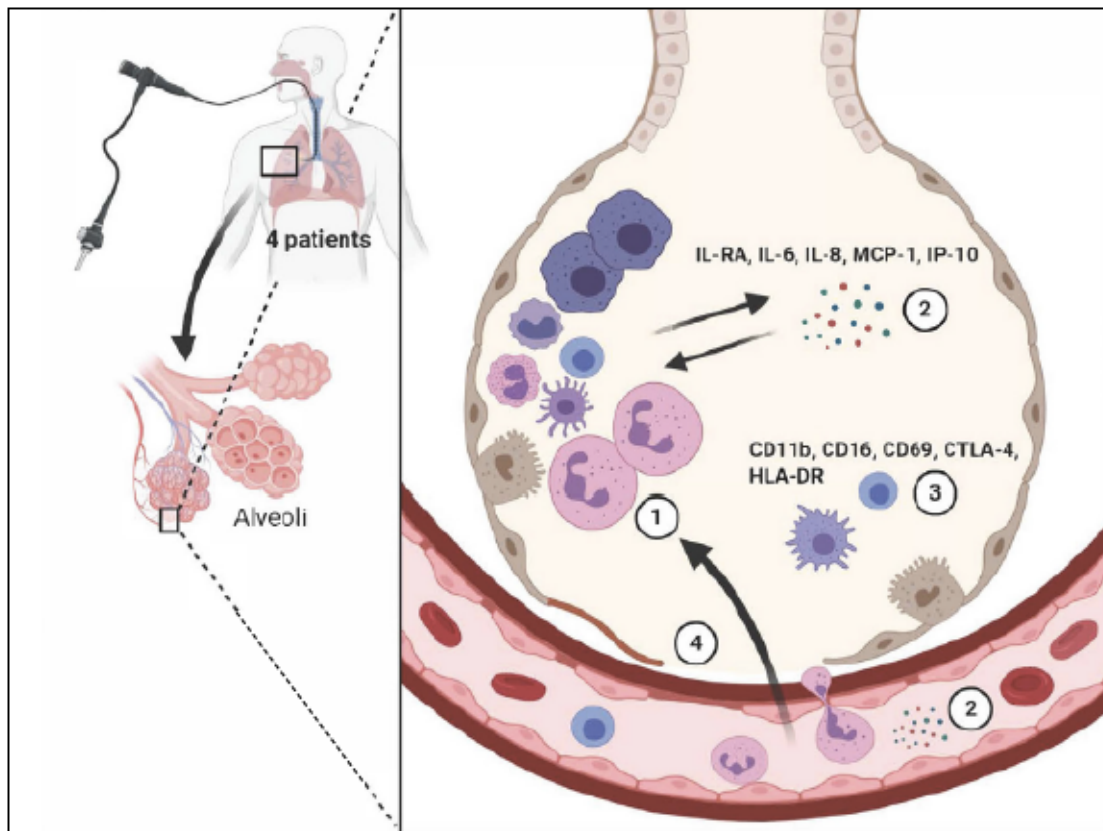
Il a été démontré que les cytokines jouent un rôle déterminant dans la génération de réponses innées protectrices dans la pneumonie bactérienne. Ces cytokines comprennent le TNF, l'IL-1 β , l'IL-12 et l'IL-18, les chimiokines, le GM-CSF et l'IFN- γ [137]. Bien qu'une réponse inflammatoire exubérante induite par les cytokines soit nécessaire, l'ampleur de cette réponse doit être contrôlée et compartimentée de manière appropriée pour éviter une lésion tissulaire excessive et un débordement des effets des cytokines dans la circulation systémique. Par exemple, les cytokines TNF et l'IL-1 β sont nécessaires pour une immunité innée et adaptative efficace, mais peuvent également déclencher une cascade d'événements entraînant une instabilité hémodynamique et des lésions des organes cibles lorsqu'elles sont présentes dans la circulation [359].

Comme attendu, ces médiateurs inflammatoires sont libérés au site de l'agression. Il existe de nombreux exemples qui illustrent la présence de niveaux accrus de cytokines pro-inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) après une lésion thoracique [360], une pneumonie acquise sous ventilation mécanique [361], chez des patients atteints du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) [362–365] ou avec une pneumonie bactérienne [366]. Une production de cytokines peut même être limitée au poumon infecté

par rapport au poumon controlatéral non infecté [366]. Les observations faites dans des modèles animaux et chez des patients atteints de pneumonie indiquent que la réponse inflammatoire dans la pneumonie bactérienne est principalement compartimentée au poumon. Par exemple, l'administration intratrachéale de LPS à des rongeurs entraîne une élévation marquée du TNF dans le LBA sans augmentation détectable des taux plasmatiques de TNF, alors que l'administration intraveineuse de LPS entraîne une induction substantielle de TNF dans le plasma mais pas dans les poumons [367, 368]. Plus récemment, cette compartimentalisation a été observée dans la pneumonie liée au SARS-CoV-2 (**Figure 15**) dans laquelle les taux de cytokines et chimiokines circulants, dont le TNF, l'IL-6 [369], l'IL-8, l'IP-10 et le MCP-1 [370], étaient plus faibles par rapport au site infectieux pulmonaire et peu associés à la sévérité des patients et au pronostic vital [371]. De même, les altérations des populations de lymphocytes T étaient nettement compartimentalisées dans cette infection [370]. Ainsi, dans le liquide de LBA, la population de lymphocytes T comprenait des cellules Treg et des cellules Th17 plus fréquentes et présentait une surexpression des marqueurs d'activation, comparativement au compartiment sanguin [370]. De plus, dans le LBA, une majorité de neutrophiles immatures et dans une moindre mesure de monocytes (CD14⁺ HLA-DR⁺), avec une surexpression de récepteurs de surface activateurs (CD64, CD16, HLA-DR, CD11b et CD69) étaient observés. En comparaison, les monocytes sanguins étaient moins activés avec une diminution de l'expression d'HLA-DR [370].

Ainsi, il existe des données expérimentales animales et humaines qui suggèrent la variabilité de la réponse immune en fonction de l'hôte, de l'organe concerné et de l'agent pathogène en cause et qui nous incite à étudier non pas le sepsis dans sa globalité mais de manière plus fine dans l'organe en cause et son environnement immunitaire.

Figure 15. Compartimentalisation immunophénotypique dans le SDRA à SARS-CoV-2.
Adaptée de [370].



1. Recrutement alvéolaire des neutrophiles immatures et des monocytes/macrophages. Peu de lymphocytes T, B et de cellules dendritiques. Proportion élevée de lymphocytes T régulateurs et de lymphocytes Th17 dans le compartiment alvéolaire vs le compartiment sanguin.
 2. hyperinflammation
 3. Activation des cellules immunitaires plus importante dans le compartiment alvéolaire
 4. Dommage alvéolaire diffus, liquide alvéolaire riche en protéine et érythrocytes.
- Abréviations : CTLA : antigène lymphocytaire cytotoxique ; IL : interleukine ; IP-10 : protéine 10 induite par l'interféron- γ ; HLA : antigène leucocytaire humain ; MCP-1 : protéine 1 chémo-attractante des monocytes.

4.3. Biomarqueurs pour l'identification de l'immunodépression post-septique

Divers biomarqueurs pour identifier voire pronostiquer le dysfonctionnement immunitaire induit par le sepsis ont été utilisés sur la base de l'évolution de nos connaissances sur les récepteurs des cellules immunitaires, leurs ligands et les voies de signalisation. L'utilisation de biomarqueurs d'immunosuppression dans la pratique clinique nécessite des analyses relativement simples, rapides et reproductibles dans des échantillons biologiques qui

peuvent être facilement obtenus. Le premier est une réduction démontrable de la production *ex vivo* de TNF à partir de leucocytes circulants stimulés avec du LPS, telle que mesurée par un dosage immuno-enzymatique (ELISA) ou d'autres types de dosage immunitaire [372]. Cependant, cette approche est limitée par un manque de standardisation entre les investigateurs. Une autre approche utilise une analyse par cytométrie en flux avec des anticorps marqués par un fluorochrome pour déterminer si l'expression HLA-DR des monocytes sanguins CD14+ est diminuée en deçà d'un seuil de 5 000 anticorps/cellule en tant que substitut de l'immunosuppression induite par le sepsis, devenu le biomarqueur le plus étudié et le plus validé dans ce domaine [373]. Des méthodes alternatives pour identifier l'immunosuppression induite par le sepsis sont à l'étude. Une approche pour examiner l'expression d'HLA-DR monocyttaire consiste à mesurer les gènes liés au CMH II par RT-PCR quantitative (transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase), qui peut être moins sensible aux variations analytiques et peut être incorporée dans des tests au lit des patients [374]. D'autres biomarqueurs potentiels peuvent se trouver dans la voie PD-1/PD-L1. Une étude récente a rapporté deux phénotypes communs de survivants au choc septique basés sur les taux circulants de protéine C-réactive et de PD-L1 soluble, dont l'un présentait une élévation persistante des deux biomarqueurs et un risque plus élevé de réadmission et de mortalité [375]. Cette étude a proposé le PD-L1 soluble circulant comme marqueur d'immunosuppression post-septique, mais cette association n'a pas encore été établie à l'aide de tests cellulaires et fonctionnels.

Les biomarqueurs du sepsis, y compris ceux de l'immunosuppression induite, ont presque exclusivement été évalués dans le sang ou les cellules sanguines. De telles analyses sont entravées par le fait qu'elles ne donnent pas nécessairement un aperçu de l'état immunitaire au niveau tissulaire. De plus, d'autres études sont justifiées pour obtenir un aperçu de la dynamique des altérations immunitaires par rapport à l'infection en cause. Idéalement, les biomarqueurs devraient être mesurables au chevet du patient et fournir des informations en temps réel sur l'état physiopathologique et le dysfonctionnement immunitaire chez chaque patient individuellement. Les biomarqueurs doivent également fournir des informations sur la fonction et/ou l'activité d'une voie immunologique ciblée par une intervention thérapeutique. S'ils sont adéquats, ces biomarqueurs peuvent être utilisés pour sélectionner

des patients pour une thérapie ciblée et pour surveiller l'effet spécifique de cette intervention sur le système immunitaire.

I. Objectifs du travail

Le SDRA est par définition un diagnostic syndromique plutôt qu'une entité pathologique spécifique. Ainsi, les patients atteints de SDRA présentent une grande hétérogénéité dans leurs phénotypes cliniques, physiologiques, radiologiques et biologiques [39]. Depuis la première définition consensuelle du SDRA, cette hétérogénéité a été reconnue comme un obstacle potentiel à la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques bénéfiques, mais à ce jour il n'y a pas de consensus sur l'approche à utiliser pour optimiser le phénotypage de ce syndrome avec des outils simples.

Plus de 50 ans après sa définition originelle, le SDRA reste fréquent et son pronostic sombre [5]. La pandémie mondiale de SARS-CoV-2 a affecté des millions de personnes dans le monde et l'incidence du SDRA est passée de 300 000 cas sur 18 mois avant la pandémie à 2,5 millions de cas sur 18 mois [94] mettant plus que jamais en avant la nécessité de mieux comprendre la physiopathologie de cette entité. Des progrès substantiels ont été réalisés au cours des cinq dernières décennies dans la compréhension de l'épidémiologie et de la biologie de ce syndrome hétérogène, et dans le développement d'une approche fondée sur des preuves pour les soins de support, ainsi que dans la recherche assidue et le traitement de la cause sous-jacente du SDRA. Les orientations futures comprennent l'identification des éléments de traitement qui s'appliquent largement à tout patient répondant aux critères diagnostiques et des éléments qui devraient être personnalisés en fonction d'aspects spécifiques de la physiologie et de la biologie qui pourraient identifier un sous-groupe plus réceptif au traitement.

L'analyse en cluster des données sur les biomarqueurs des protéines plasmatiques de patients SDRA a permis d'identifier deux sous-phénotypes distincts du SDRA : réactif et non inflammatoire [376]. Le sous-phénotype réactif avait un plus mauvais pronostic clinique. Cependant, de nos jours aucun biomarqueur n'a pu être identifié permettant la prédiction du pronostic clinique ou être une cible thérapeutique efficace. Il semble néanmoins que la plupart des études qui traitent de cette problématique se sont focalisées sur les biomarqueurs plasmatiques alors que l'organe cible, c'est-à-dire le poumon, serait possiblement plus informatif.

L'objectif principal de ce travail a été de chercher à identifier des biomarqueurs présents dans le compartiment alvéolaire ou sanguin qui permettraient de différencier les patients atteints de SDRA secondaire à une pneumonie infectieuse, selon leur pronostic clinique. Les travaux de cette thèse avaient également pour objectif de mieux comprendre les liens entre ces biomarqueurs dans chaque compartiment et les traits physiopathologiques du SDRA.

Pour ce faire, nous avons développé un projet de recherche autour de trois grands axes de travail, en tirant avantage de la constitution d'une cohorte prospective de patients pris en charge pour SDRA secondaire à une pneumonie infectieuse. Les objectifs étaient les suivants :

1. Déterminer la valeur pronostique des *neutrophil extracellular traps* (NETs)
2. Identifier des biomarqueurs alvéolaires biologiques et cellulaires pronostiques dans le SDRA infectieux (hors pneumonie SARS-CoV-2) et étudier leur compartimentalisation alvéole-sang
3. Étudier l'activité fonctionnelle des monocytes alvéolaires et circulants
4. Identifier des biomarqueurs biologiques et cellulaires pronostiques dans le SDRA COVID-19

Ce travail de thèse a donné lieu à la rédaction de quatre articles originaux (trois articles signés en 1^{er} auteur, un signé en co-2^{ème} auteur) et une lettre, signée en 1^{er} auteur.

II. RESULTATS

1. Article 1: Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients with Pneumonia-related Acute Respiratory Distress Syndrome

Inès Bendib, Luc de Chaisemartin, Vanessa Granger, Frédéric Schlemmer, Bernard Maitre, Sophie Hüe, Mathieu Surenaud, Asma Beldi-Ferchiou, Guillaume Carteaux., Keyvan Razazi, Sylvie Chollet-Martin, Armand Mekontso Dessap, Nicolas de Prost.

Anesthesiology 2019; 130:581–91.

Assorti de la publication d'une lettre:

Understanding the Role of Neutrophil Extracellular Traps in Patients With Severe Pneumonia and ARDS

Inès Bendib, Luc de Chaisemartin, Armand Mekontso Dessap, Sylvie Chollet-Martin, Nicolas de Prost

Chest 2019 ;156(6) :1278-80.

La lésion pulmonaire aiguë est caractérisée par l'afflux massif de neutrophiles dans les poumons [10, 91]. Au cours du SDRA expérimental, les NETs sont associés à la survenue de lésions alvéolaires et de la mort des cellules épithéliales [377]. La prévention de ces dommages, soit par le biais d'une déplétion des neutrophiles, soit d'un traitement par DNase [10], ont été bénéfiques dans un modèle murin de lésion pulmonaire aiguë [143]. *A contrario*, la déplétion des NETs par l'administration de rhDNase, dans un modèle murin de ligature ponction caecale, entravait la réponse immunitaire précoce et aggravait des animaux soumis à un sepsis polymicrobien [378].

Mieux préciser les rôles des NETs dans la physiopathologie du SDRA est donc pertinent car les NETs sont des cibles thérapeutiques potentielles dans le SDRA. Les preuves actuellement disponibles soutenant l'hypothèse selon laquelle les effets néfastes des NETs dépassent leurs effets protecteurs dans le SDRA clinique, par opposition au SDRA expérimental, sont rares. L'objectif de cette étude de cohorte prospective monocentrique

était d'étudier la relation entre les concentrations de NETs mesurées dans le LBA de patients pris en charge pour un SDRA secondaire à une pneumonie infectieuse et le nombre de jours vivants sans ventilation mécanique à 28 jours (J28).

Trente-cinq patients et quatre patients témoins étaient inclus. Les NETs étaient quantifiés dans le LBA et le sérum par méthode ELISA. Nous n'avons pas observé de relation significative entre la concentration des NETs dans le LBA des patients SDRA et le nombre de jours vivants sans ventilation mécanique à J28 (régression multiple ajustée sur le volume courant et le rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, voir **eTable6** du supplément en ligne de l'article, **page 188 du manuscrit**). Nous observons des concentrations de NETs plus élevées dans le LBA que dans le sang des patients SDRA et dans le LBA des patients que dans celui des témoins (**Figure 1** de l'article). Les concentrations alvéolaires de NETs étaient significativement corrélées à celles de l'interleukine-8 (**Table 1** de l'article) et au pourcentage de polynucléaires neutrophiles dans le LBA (**Figure 3** de l'article).

Ce travail est assorti de la publication d'une lettre, publiée en réponse à une revue générale publiée par Twaddell et coll. [379]. Ces auteurs ont examiné le rôle des NETs dans les maladies respiratoires. Nous discutons dans cette lettre les quatre études cliniques publiées à date évaluant la relation entre les concentrations de NETs (dans les compartiments alvéolaires ou sanguins) et le pronostic des patients. L'analyse de cette littérature met en évidence une grande hétérogénéité des données.

ANESTHESIOLOGY

Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients with Pneumonia-related Acute Respiratory Distress Syndrome

Inès Bendib, M.D., Luc de Chaisemartin, PharmD, Ph.D.,
Vanessa Granger, PharmD, Ph.D.,
Frédéric Schlemmer, M.D., Ph.D., Bernard Maitre, M.D., Ph.D.,
Sophie Hùe, M.D., Ph.D., Mathieu Surenard, M.Sc.,
Asma Beldi-Ferchiou, PharmD, Ph.D.,
Guillaume Carteaux, M.D., Ph.D., Keyvan Razazi, M.D.,
Sylvie Chollet-Martin, M.D., Ph.D.,
Armand Mekontso Dessap, M.D., Ph.D.,
Nicolas de Prost, M.D., Ph.D.

ANESTHESIOLOGY 2019; 130:581–91

EDITOR'S PERSPECTIVE

What We Already Know about This Topic

- Neutrophil extracellular traps are increasingly recognized as pathogenic in acute injury, but their role in sepsis-related acute respiratory distress syndrome is unknown

What This Article Tells Us That Is New

- In 35 patients with acute respiratory distress syndrome secondary to pneumonia, neutrophil extracellular traps were elevated in the blood and bronchoalveolar fluid, and associated with interleukin-8 and neutrophil levels; however, higher (vs. lower) levels of neutrophil extracellular traps were not associated with mortality or duration of mechanical ventilation

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) is the most severe form of acute respiratory failure, resulting from direct or indirect insults to the alveolo-capillary

ABSTRACT

Background: Neutrophil extracellular traps have been associated with tissue damage. Whether these are involved in the pathogenesis of human acute respiratory distress syndrome (ARDS) and could be a potential therapeutic target is unknown. The authors quantified bronchoalveolar and blood neutrophil extracellular traps in patients with pneumonia-related ARDS and assessed their relationship with ventilator-free days.

Methods: Immunocompetent patients with pneumonia and moderate or severe ARDS ($n = 35$) and controls ($n = 4$) were included in a prospective monocentric study. Neutrophil extracellular trap concentrations were quantified (as DNA–myeloperoxidase complexes) in bronchoalveolar lavage fluid and serum by enzyme-linked immunosorbent assay. The relationship between bronchoalveolar lavage neutrophil extracellular trap concentrations and the primary clinical endpoint (*i.e.*, the number of live ventilator-free days at day 28) was assessed using linear regression analyses.

Results: There was no significant relationship between bronchoalveolar lavage neutrophil extracellular trap concentrations and ventilator-free days by multiple regression analysis (β coefficient = 2.40; 95% CI, -2.13 to 6.92; $P = 0.288$). Neutrophil extracellular trap concentrations were significantly higher in bronchoalveolar lavage than in blood of ARDS patients (median [first to third quartiles]: 154 [74 to 1,000] vs. 26 [4 to 68] arbitrary units, difference: -94; 95% CI, -341 to -57; $P < 0.0001$). Bronchoalveolar concentrations of patients were higher than those of controls (154 [74 to 1,000] vs. 4 [4 to 4] arbitrary units, difference: -150; 95% CI, -996 to -64; $P < 0.001$) and associated with bronchoalveolar interleukin-8 (Spearman's $\rho = 0.42$; $P = 0.012$) and neutrophil concentrations ($\rho = 0.57$; $P < 0.0001$). Intensive care unit mortality (12%, $n = 2$ of 17 vs. 17%, $n = 3$ of 18; $P > 0.99$) and the number of ventilator-free days at day 28 (22 [14 to 25] vs. 14 [0 to 21] days; difference: -5; 95% CI, -15 to 0; $P = 0.088$) did not significantly differ between patients with higher ($n = 17$) versus lower ($n = 18$) bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations.

Conclusions: Bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentration was not significantly associated with mechanical ventilation duration in pneumonia-related ARDS.

(ANESTHESIOLOGY 2019; 130:581–91)

membrane. ARDS affects 10% of all intensive care unit patients and 23% of those receiving mechanical ventilation.¹ Despite major improvements in mechanical ventilation strategies during the past decades,² the hospital mortality of ARDS patients remains as high as 40%.³ In fact,

This article is featured in "This Month in Anesthesiology," page 1A. Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are available in both the HTML and PDF versions of this article. Links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the Journal's Web site (www.anesthesiology.org). This article has a visual abstract available in the online version. Portions of the present work were presented previously in abstract form at the 2018 French Intensive Care Society meeting (Paris, France). S.C.-M. and A.M.D. contributed equally to this work.

Submitted for publication March 30, 2018. Accepted for publication December 10, 2018. From the Medical Intensive Care Unit, DHUA-TV8, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Créteil Cedex 94010, France (I.B., G.C., K.R., A.M.D., N.d.P.); Groupe de Recherche Clinique CARIMAS, Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris Est Créteil, Créteil Cedex 94010, France (I.B., G.C., K.R., A.M.D., N.d.P.); Immunology Laboratory « Autoimmunité et Hypersensibilité », Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France (L.d.C., V.G., S.C.-M.); Pulmonology Unit, Medical Intensive Care Unit, DHUA-TV8, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Créteil Cedex 94010, France (F.S., B.M.); Immunology Laboratory, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Créteil Cedex 94010, France (S.H., M.S., A.B.-F.).

Copyright © 2019, the American Society of Anesthesiologists, Inc. Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved. Anesthesiology 2019; 130:581–91

none of the pharmacologic interventions tested in ARDS, including—but not limited to—steroids,³ β_2 -agonists,⁴ or statins,⁵ has shown significant survival benefit. The identification of biomarkers of disease severity that would be potential therapeutic targets is thus a key step for developing novel treatments for ARDS.

ARDS pathogenesis is characterized by the influx of protein-rich edema fluid into the air spaces as a consequence of increased permeability of the alveolo-capillary membrane. High alveolar concentrations of inflammatory mediators trigger lung neutrophil influx and activation, leading to the release of reactive oxygen species, proteases, and cytokines, all of which contribute to alveolar injury.^{6,7} The key role of neutrophils in the pathogenesis of ARDS was suggested by experimental models showing that their elimination decreased the severity of acute lung injury⁸ as well as by the clinical observation that neutropenia recovery in neutropenic patients with lung injury was associated with pulmonary function deterioration.⁹

Neutrophil extracellular traps are extracellular fibers composed of DNA, histones, and granule-derived proteins such as elastase or myeloperoxidase released by neutrophils during a process termed NETosis.^{10,11} Neutrophil extracellular traps can trap and kill extracellular pathogens and have been shown to be beneficial during infections: deficiency in neutrophil extracellular trap production¹²⁻¹⁴ or neutrophil extracellular trap scaffold destruction by bacterial DNases^{15,16} increased the susceptibility to infections. On the other hand, experimental data suggesting that neutrophil extracellular traps may also cause adverse tissue injury to the host have accumulated: extracellular histones (the major components of neutrophil extracellular traps) are highly toxic and induce respiratory failure when infused intravenously,¹⁷ and neutrophil extracellular traps have been detected in the lungs of mice subjected to endotoxemia¹⁸ or aggressive mechanical ventilation.¹⁹ Additionally, plasma²⁰ and lung²¹ neutrophil extracellular trap concentrations have recently been correlated with the severity of human ARDS. A significant body of literature also illustrated the detrimental role of neutrophil extracellular traps in various clinical conditions, including autoimmune disorders, thrombosis, and cystic fibrosis, but lung and blood neutrophil extracellular trap production in human ARDS have not been comprehensively explored.

Whether neutrophil extracellular traps are involved in the pathogenesis of human ARDS and could be a potential therapeutic target is still unknown. In the current study, we hypothesized that (1) neutrophil extracellular traps are produced in the lungs of patients with pneumonia-related ARDS and associated with regional neutrophil infiltration, and that (2) bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations are associated with poorer outcome, as assessed by live ventilator-free days at day 28.

Materials and Methods

Methods are further described in the supplemental digital content (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>).

Study Design

This prospective, single-center, observational cohort study was approved by the institutional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France V, Paris, France). Consecutive patients diagnosed with pneumonia-related ARDS²² admitted to the medical intensive care unit of Henri Mondor Hospital, Créteil, France, from January 2014 to May 2015 were eligible for inclusion in the study. Informed consent was obtained from all included patients or their relatives. No statistical power calculation was conducted before the study because of the lack of data available regarding lung neutrophil extracellular trap production during human ARDS at the time the study was designed. An 18-month inclusion period had *a priori* been defined.

Patients and Data Collection

All patients with moderate or severe pneumonia-related ARDS (Berlin definition²²) were included consecutively with the following inclusion criteria: tracheal intubation and mechanical ventilation since less than 72 h; pulmonary infection diagnosed less than 7 days before; bilateral pulmonary infiltrates on chest x-ray; a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio not greater than 200 mmHg with a positive end-expiratory pressure of at least 5 cm H_2O . Noninclusion criteria were as follows: age younger than 18 yr, pregnancy, chronic respiratory failure requiring long-term oxygen therapy, Child-Pugh C liver cirrhosis, lung fibrosis, immunosuppression, SAPS II (Simplified Acute Physiology II score) greater than 90, irreversible neurologic disorders, or patients with withholding or withdrawing of life-sustaining therapies and profound hypoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ less than 75 mmHg).

Control patients (*i.e.*, non-mechanically ventilated patients free of ARDS, any active infection, diffuse interstitial pneumonia, or immunosuppression; $n = 4$), undergoing a bronchoscopy with bronchoalveolar lavage and blood sampling as part of routine care, were also included (eTable 1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>).

ARDS patients received mechanical ventilation using a standardized protective ventilation strategy.²³ Other treatments, including neuromuscular blocking agents,²⁴ nitric oxide inhalation,²⁵ prone positioning,²⁶ and venovenous extracorporeal membrane oxygenation, were administered depending on the severity of ARDS.²⁷ The prevention of ventilator-associated pneumonia followed a multifaceted program²⁸; sedation and mechanical ventilation weaning followed standardized protocols.²⁹

Demographics and clinical and laboratory variables were recorded upon intensive care unit admission, at sample collection time points, and during intensive care unit stay. Other recorded variables included the use of adjuvant therapies for ARDS, the need for hemodialysis or vasopressors, corticosteroids administration, the number of ventilator- and organ failure-free days at day 28, and the duration of mechanical ventilation and of intensive care unit stay in all patients and in survivors only and intensive care unit mortality. The primary clinical endpoint of the study was the number of live ventilator-free days at day 28.

Measurements of Bronchoalveolar Lavage Fluid and Blood Neutrophil Extracellular Trap and Cytokine Neutrophil Extracellular Trap Concentrations

Bronchoalveolar lavage fluid was collected from all ARDS patients during a bronchoscopy within 48 h of ARDS onset (day 1 to 2 sample) and, for patients who were alive and still had ARDS criteria, 5 to 7 days thereafter (day 5 to 7 sample). Bronchoalveolar lavage fluid samples were also collected from controls. A blood sample for the measurement of serum neutrophil extracellular trap and cytokine concentrations was obtained at the same time.

Neutrophil extracellular traps were quantified by measuring myeloperoxidase-DNA complexes in serum and bronchoalveolar lavage fluid samples using a previously described capture enzyme-linked immunosorbent assay.²⁰ Optical density was measured at 405 nm. A standard curve was obtained by dilution of a strongly positive serum. Samples were interpolated from the standard curve using the sigmoidal dose-response equation and results were expressed in arbitrary units (detection range: 4–1,000 arbitrary units). Optical density values that were outside the detection range of arbitrary units (*i.e.*, values less than 4 and greater than 1,000 arbitrary units) were replaced by the threshold value.

Serum and bronchoalveolar lavage fluid concentrations of the main pro- and anti-inflammatory cytokines involved in neutrophil chemotaxis and activation (interleukin-6, interleukin-8, tumor necrosis factor- α ²¹) or inhibition (interleukin-10), as well as lung epithelium injury markers (surfactant protein-D and receptor for advanced glycation end-products²²) were measured using a Human Magnetic Luminex Assay (Biotecne – R&D Systems, UK) and expressed in ng/mL.

Statistical Analysis

This is a primary analysis of this dataset. Continuous variables are reported as median [first–third quartiles] or mean \pm SD, as appropriate, and compared using the unpaired Student's *t* test or the Mann–Whitney test. For comparison of neutrophil extracellular trap bronchoalveolar lavage concentrations at different time points, the Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used. The median differences and

their 95% CI were computed using the Hodges–Lehman estimator. The normality of the data was tested using the Shapiro–Wilk normality test. Categorical variables are reported as number and percentages (95% CI) and compared using the chi-squared or Fisher test, as appropriate. When more than two groups were compared, comparisons were performed using the Kruskal–Wallis test and, when the global *P* value less than 0.05, *post hoc* comparisons were performed using Dunn's multiple comparison test. Missing data were not replaced. No outlier value was excluded from the current dataset. Because no clinically relevant neutrophil extracellular trap concentration threshold value was previously reported in bronchoalveolar lavage fluid of ARDS patients, we had *a priori* planned to categorize patients according to median bronchoalveolar lavage neutrophil extracellular trap concentrations (*i.e.*, patients with “higher” *vs.* patients with “lower” bronchoalveolar lavage neutrophil extracellular trap concentrations). The relationship between neutrophil extracellular trap concentrations in bronchoalveolar lavage (expressed as optical density) and live ventilator-free days at day 28 was further assessed using uni- and multiple linear regression analyses. Two covariates included in an exploratory multivariable analysis obtained on the day of bronchoalveolar lavage 1 collection were selected on their known prognosis value during ARDS. The relationship between neutrophil extracellular trap concentrations in bronchoalveolar lavage (expressed as optical density) and biologic (*e.g.*, bronchoalveolar neutrophil and cytokines) variables was assessed using linear regressions or Spearman's correlations. All statistical analyses were two-tailed, and a *P* value less than 0.05 was considered significant. Analyses were conducted using the SPSS Base 21.0 statistical software package (SPSS Inc., USA) and GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, USA).

Results

Seventy-eight patients with moderate-to-severe pneumonia-related ARDS were admitted to the intensive care unit during the 17-month study period, of whom 43 had noninclusion criteria and 35 were included in the study (eFigure 1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>). A microbiologic documentation was obtained in 83% (*n* = 29/35) of included ARDS patients (eTable 2, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>).

Production of Neutrophil Extracellular Traps in the Lungs of Patients with Pneumonia-related ARDS

The first bronchoalveolar lavage and blood samples were obtained after a median delay of 1 day after tracheal intubation (eTable 3, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>). Within 48 h of tracheal intubation (days 1 to 2 time point), patients with pneumonia-related ARDS exhibited significantly higher bronchoalveolar

lavage fluid neutrophil extracellular trap concentrations than controls ($n = 4$) (median [1st to 3rd quartiles]: 154 [74 to 1,000] vs. 4 [4 to 4] arbitrary units, difference: -150 ; 95% CI, -996 to -64 ; $P = 0.0002$; fig. 1), whereas the difference of serum concentrations did not reach statistical significance ($P = 0.072$). Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of neutrophil extracellular traps were also six times higher than serum concentrations (26 arbitrary units [4 to 68]; difference: -94 ; 95% CI, -341 to -57 ; $P < 0.0001$) in ARDS patients, suggesting a lung production of neutrophil extracellular traps during ARDS. Serum neutrophil extracellular trap concentrations of patients with higher versus lower bronchoalveolar lavage neutrophil extracellular traps did not differ significantly (eTable 4, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>).

Neutrophil extracellular trap kinetics, which could be studied in 18 patients also sampled at day 5 to 7, showed that median bronchoalveolar lavage fluid concentrations did not vary significantly over time ($P = 0.854$; fig. 2), consistent with the lack of significant changes in bronchoalveolar lavage neutrophils between the two time points (65% [31 to 75] vs. 23% [13 to 57], difference: -11 ; 95% CI, -38 to 5 ; $P = 0.243$ by Wilcoxon matched-pairs signed rank test). In contrast, serum neutrophil extracellular trap concentrations decreased significantly over time (from 47

[4 to 488] to 8 [4 to 57] arbitrary units, difference: -21 ; 95% CI, -80 to 0 ; $P = 0.029$ by Wilcoxon matched-pairs signed rank test; fig. 2).

Bronchoalveolar Lavage Cellularity, Cytokines, and Bronchoalveolar Injury Biomarker Concentrations

There was a strong correlation between bronchoalveolar neutrophils (in percentage of total bronchoalveolar lavage cell numbers: 65% [31 to 75] for the whole population) and neutrophil extracellular trap concentrations (Spearman's $\rho = 0.57$; $P < 0.0001$; fig. 3), illustrating that more lung neutrophils were associated with higher bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations. The correlation between bronchoalveolar macrophages and neutrophil extracellular trap concentrations mirrored that of neutrophils (*i.e.*, more bronchoalveolar macrophages were associated with less neutrophil extracellular trap concentrations; Spearman's $\rho = -0.52$; $P < 0.0001$; eFigure 2, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>).

The quantification of the main pro- and anti-inflammatory cytokines (*i.e.*, interleukin-6, interleukin-8,

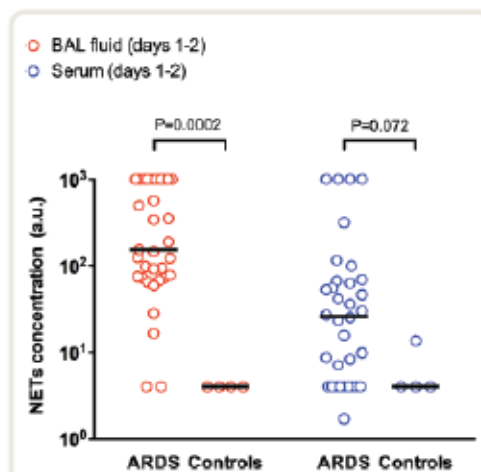


Fig. 1. Neutrophil extracellular trap measurements in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and serum of acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients ($n = 35$) and controls ($n = 4$). Neutrophil extracellular trap (NETs) concentrations in BAL fluid (red circles) of ARDS patients were significantly higher than those of controls ($P = 0.0002$). Neutrophil extracellular trap concentrations in sera (blue circles) of ARDS patients were not significantly different from those of controls ($P = 0.072$). P values come from Mann-Whitney tests. Horizontal bars represent median values.

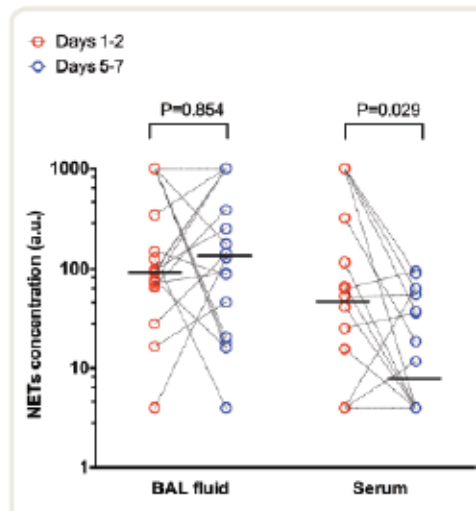


Fig. 2. Kinetics of neutrophil extracellular trap concentrations in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and plasma of acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients ($n = 18$). There was no significant change in BAL neutrophil extracellular trap concentrations over time (*i.e.*, between samples obtained at days 1 to 2 [red circles] and those obtained at days 5 to 7 [blue circles] time points, $P = 0.854$). In contrast, neutrophil extracellular trap concentrations in sera decreased significantly over time ($P = 0.029$). P values come from the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Horizontal bars represent median values. NET, neutrophil extracellular trap.

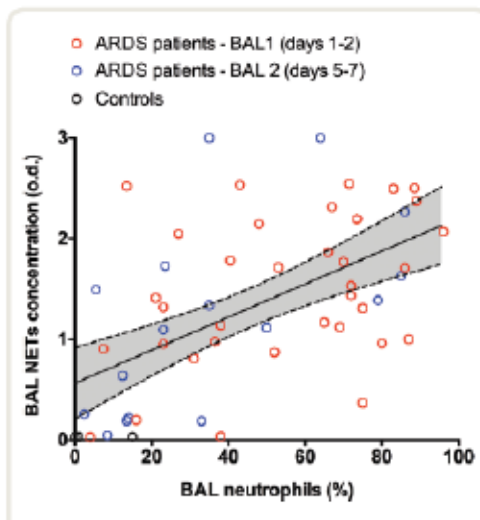


Fig. 3. Linear regression of bronchoalveolar lavage fluid neutrophil extracellular trap concentrations on bronchoalveolar neutrophils. There was a significant relationship between bronchoalveolar neutrophil extracellular traps, expressed as optical density (o.d.) values and bronchoalveolar neutrophils, as a percentage of total bronchoalveolar lavage cell numbers ($y = 0.016x + 0.564$; $R^2 = 0.32$; $P < 0.0001$), from acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients sampled at days 1 to 2 ($n = 35$; red circles) and days 5 to 7 ($n = 18$; blue circles) and controls ($n = 4$; black circles). The grayed area comprised between the dashed curves depicts the 95% CI of the regression line. BAL, bronchoalveolar lavage; NET, neutrophil extracellular trap.

interleukin-10, and tumor necrosis factor- α) and of biomarkers reflecting bronchoalveolar epithelium injury (*i.e.*, surfactant protein-D and receptor for advanced glycation end-products) showed significant differences between bronchoalveolar lavage fluid and serum concentrations of ARDS patients as compared with those of controls (fig. 4), consistent with the fact that all patients had pneumonia-related ARDS. Correlation matrices were performed to further explore the relationship between bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations of ARDS patients and cytokine or alveolar epithelial injury biomarkers and displayed a significant correlation between bronchoalveolar neutrophil extracellular trap and interleukin-8 concentrations (Spearman's $\rho = 0.42$; $P = 0.012$; table 1). In contrast, in sera of ARDS patients, none of the cytokines/alveolar epithelial injury biomarkers measured showed a significant correlation with neutrophil extracellular trap concentrations (eTable 5, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>).

Initial Presentation and Outcomes of Patients with Pneumonia-related ARDS According to Neutrophil Extracellular Trap Concentrations in Bronchoalveolar Lavage

Patients with higher ($n = 17$) versus lower ($n = 18$) neutrophil extracellular trap concentrations did not show clinically and statistically significant differences regarding age, comorbidities, and severity of illness scores at ARDS onset (eTable 3, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>). There was also no significant difference in terms of ARDS severity according to the Berlin definition. Although ARDS patients with higher bronchoalveolar lavage neutrophil extracellular trap concentrations did not show significantly different lung injury scores²⁵ ($P = 0.081$), these were less frequently receiving neuromuscular blocking agents ($P = 0.041$) at ARDS onset than others. No other significant difference was observed between these two groups at ARDS onset, including for oxygenation and respiratory mechanics variables. At the time the first bronchoalveolar lavage was sampled (*i.e.*, 24 h after ARDS onset in average), patients with higher bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations had higher $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratios than others (142 [103 to 193] vs. 242 [149 to 350] mmHg, difference: 86 [20 to 167]; $P = 0.006$), while receiving lower tidal volumes ($P = 0.021$; eTable 3, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>).

The hospital and intensive care unit mortality of ARDS patients with higher versus lower bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations was not statistically different (table 2). Although patients with higher bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations trended to require less frequent extracorporeal membrane oxygenation support and showed shorter mechanical ventilation durations than their counterparts, there was no statistically significant difference between the former and the latter regarding the number of live ventilator-free days at day 28 (22 [14 to 25] vs. 14 [0 to 21], difference: -5; 95% CI, -15 to 0; $P = 0.066$). Furthermore, there was no statistically significant association between bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations, expressed as a continuous optical density variable, and the number of live ventilator-free days at day 28 (β coefficient = 3.70; 95% CI, -0.87 to 8.30; $P = 0.084$), even after entering potentially confounding variables (*i.e.*, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ and tidal volume) in an exploratory multiple regression analysis (β coefficient = 2.40; 95% CI, -2.13 to 6.92; $P = 0.288$; eTable 6, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ALN/B860>).

Discussion

The current study aimed at quantifying for the first time concomitant bronchoalveolar and circulating neutrophil extracellular trap production in immunocompetent patients

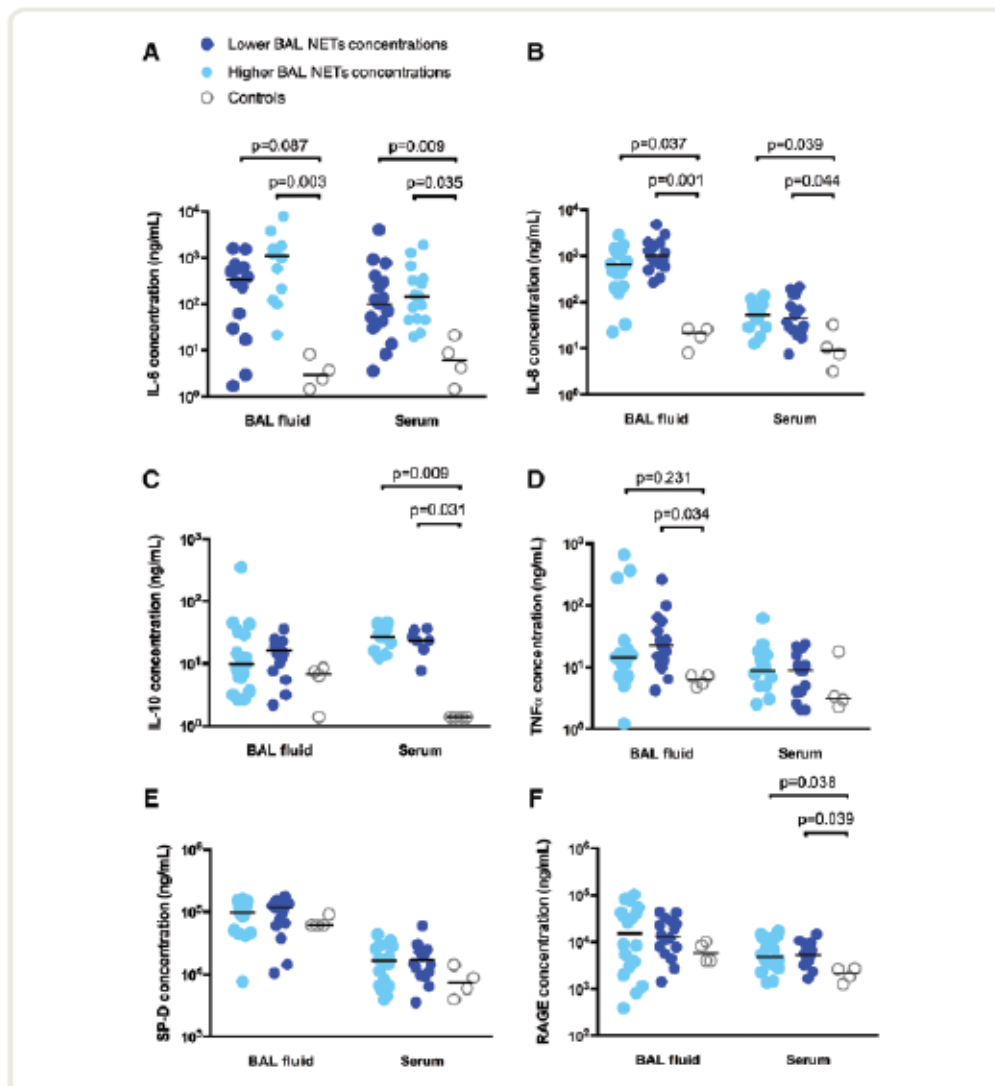


Fig. 4. Bronchoalveolar and serum concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines and of biomarkers of bronchoalveolar epithelium injury in patients with lower ($n = 18$, deep blue circles) versus higher ($n = 17$, sky blue circles) bronchoalveolar lavage neutrophil extracellular trap concentrations and in controls ($n = 4$, open circles). (A) Bronchoalveolar lavage fluid (global $P = 0.004$) and serum interleukin (IL)-6 (global $P = 0.012$) concentrations. (B) Bronchoalveolar lavage fluid (global $P = 0.002$) and serum IL-8 (global $P = 0.035$) concentrations. (C) Bronchoalveolar lavage fluid (global $P = 0.184$) and serum (global $P = 0.009$) IL-10 concentrations. (D) Bronchoalveolar lavage fluid (global $P = 0.037$) and serum (global $P = 0.524$) tumor necrosis factor (TNF)- α concentrations. (E) Bronchoalveolar lavage fluid (global $P = 0.434$) and serum (global $P = 0.146$) surfactant protein-D (SP-D) concentrations. (F) Bronchoalveolar lavage fluid (global $P = 0.520$) and serum (global $P = 0.033$) receptor for advanced glycation end-products (RAGE) concentrations. Global P values come from the Kruskal-Wallis test; *post hoc* comparisons were performed using Dunn's test when the global P value was less than 0.05 (corresponding P values shown on the figure). BAL, bronchoalveolar lavage; NETs, neutrophil extracellular traps. Horizontal bars represent median values.

Downloaded from <http://pccm.aaanp.org/> by guest on 16 September 2021

Table 1. Correlation Matrix Exploring the Relationship between Bronchoalveolar Neutrophil Extracellular Trap Concentrations, Bronchoalveolar Cytokines, and Bronchoalveolar Alveolar Epithelium Injury Biomarkers Levels.

BAL biomarkers		NETs (o.d.)	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- α	SP-D	RAGE
NETs (o.d.)	Rho	1.000	0.123	0.425	-0.055	0.116	0.096	-0.052
	Pvalue	—	0.452	0.012	0.759	0.512	0.590	0.771
	N	35	34	34	34	34	34	34
IL-6	Rho		1.000	0.105	0.507	0.913	0.290	0.723
	Pvalue		—	0.270	< 0.0001	< 0.0001	0.096	< 0.0001
	N		34	34	34	34	34	34
IL-8	Rho			1.000	-0.023	0.262	-0.006	0.030
	Pvalue			—	0.896	0.135	0.975	0.864
	N			34	34	34	34	34
IL-10	Rho				1.000	0.767	0.172	0.571
	Pvalue				—	< 0.0001	0.331	< 0.0001
	N				34	34	34	34
TNF- α	Rho					1.000	0.282	0.582
	Pvalue					—	0.107	< 0.0001
	N					34	34	34
SP-D	Rho						1.000	0.570
	Pvalue						—	< 0.0001
	N						34	34
RAGE	Rho							1.000
	Pvalue							—
	N							34

P values and correlation coefficients (ρ) were computed using Spearman's test. Neutrophil extracellular traps (NETs) levels are expressed in optical densities (o.d.). N indicates the number of samples available for each biomarker. Bold indicates statistically significant differences. BAL, bronchoalveolar lavage; IL, interleukin; RAGE, receptor for advanced glycation end-products; SP-D, surfactant protein-D; TNF, tumor necrosis factor.

Table 2. Outcomes of ARDS Patients (n = 35) Having Lower (n = 18) or Higher (n = 17) Bronchoalveolar Lavage Fluid Neutrophil Extracellular Trap Concentrations within 72 h of Intubation

Variables*	Lower BAL NETs (n = 18)	Higher BAL NETs (n = 17)	P Value
Ventilator-associated pneumonia	6 (33)	4 (23)	0.711
Shock doses steroids	5 (28)	1 (6)	0.402
Shock	12 (67)	10 (59)	> 0.99
Renal replacement therapy	7 (39)	3 (18)	0.264
ECMO	6 (33)	1 (6)	0.028
MV duration, days			
All patients	10 [5–23]	4 [2–10]	0.024
Surviving patients	11 [6–24]	6 [3–13]	0.026
MV-free days at day 28, days	14 [0–21]	22 [14–25]	0.056
Organ-failure free days at day 28, days	14 [0–21]	22 [13–24]	0.061
ICU length of stay, days			
All patients	19 [9–36]	10 [7–15]	0.058
Surviving patients	22 [9–38]	10 [7–16]	0.026
ICU mortality	3 (17)	2 (12)	> 0.99
Hospital mortality	3 (17)	3 (18)	> 0.99

Continuous variables are presented as mean \pm SD when normally distributed and median [first–third quartiles] otherwise; P values come from the unpaired t test or the Mann-Whitney test, as appropriate. Categorical variables are shown as n (%). P values come from the chi-squared or the Fisher exact test, as appropriate. Bold indicates statistically significant differences. ARDS, acute respiratory distress syndrome; BAL, bronchoalveolar lavage; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; ICU, intensive care unit; MV, mechanical ventilation; NETs, neutrophil extracellular traps. *None of the data pertaining to the variables presented in this table were missing.

with pneumonia-related ARDS. The main results of our study are as follows: (1) ARDS patients not only had six-times higher bronchoalveolar than circulating neutrophil extracellular trap concentrations, but also showed higher bronchoalveolar concentrations than controls (although

serum concentrations did not significantly differ), suggesting a lung-borne production of neutrophil extracellular traps during ARDS; (2) bronchoalveolar but not serum neutrophil extracellular trap concentrations exhibited a stable kinetics over the first week of ARDS and were tightly

correlated with lung neutrophil infiltration and bronchoalveolar interleukin-8 concentrations; and (3) bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentration was not significantly associated with mechanical ventilation duration, as reflected by live ventilator-free days at day 28.

Bronchoalveolar and circulating neutrophil extracellular trap concentrations were quantified in 35 patients with pneumonia-related ARDS. Of note, these patients were all immunocompetent, had a microbiologic documentation in more than 80% of cases, and had all been diagnosed with moderate-to-severe ARDS requiring mechanical ventilation since less than 24 h when included in the study. As such, neutrophil extracellular trap production was quantified in a homogeneous cohort of ARDS patients. In this well characterized group of patients, bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations were six times greater than circulating concentrations. Although bronchoalveolar lavage fluid dilution precludes any accurate comparison of neutrophil extracellular trap concentrations between bronchoalveolar lavage fluid and sera to be performed, such clinically significant concentrations differences between both compartments is suggestive of a lung-borne production of neutrophil extracellular traps during ARDS. Lung infiltration by activated neutrophils is a key feature of diffuse alveolar damage, the histopathologic hallmark of ARDS. Our finding of a lung-borne production of neutrophil extracellular traps during pneumonia-related ARDS is consistent with such lung neutrophil influx as well as with previous experimental studies.^{19,24,35} Indeed, several infectious and noninfectious stimuli typically associated with ARDS have been shown to trigger regional NETosis, including live bacteria, lipopolysaccharide, interleukin-8, or reactive oxygen species.¹² In an experimental model of influenza pneumonia-related ARDS, Narasaraaju *et al.*²⁹ demonstrated that lung neutrophil extracellular trap production was induced by influenza virus and redox enzymes and correlated with the severity of lung injury. Recently, using a murine model of pneumococcal pneumonia, Moorthy *et al.*³⁴ showed that neutrophil extracellular trap generation was associated with the pneumococcal capsule thickness, which determines the susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to neutrophil-mediated killing, and proportional to the disease severity. In contrast, in a two-hit lipopolysaccharide- or ventilator-induced lung injury mouse model leading to bronchoalveolar neutrophil extracellular trap production, DNase treatment did not significantly reduce lung injury, suggesting that the pathogenicity of neutrophil extracellular traps is equivocal and may depend on the cause of acute lung injury.¹⁹ The fact that more bronchoalveolar neutrophil extracellular traps were associated with more lung neutrophils (fig. 3) and higher bronchoalveolar interleukin-8 concentrations is consistent with regional NETosis, as interleukin-8 has been previously shown to be a potent inducer of neutrophil extracellular trap formation.³⁶

Neutrophil extracellular traps kinetics were studied in 18 patients who were sampled both on days 1 to 2 and 5 to 7 after intubation. Interestingly, and although there were wide interindividual variations, the median bronchoalveolar lavage fluid concentrations did not vary significantly over time, consistent with the lack of significant changes in bronchoalveolar neutrophils. Such data suggest that lung neutrophil extracellular trap production is relatively stable during the first week of pneumonia-related ARDS. In contrast, serum neutrophil extracellular trap concentrations decreased significantly over time, illustrating that NETosis exhibited a different kinetics in blood, consistent with the fact that all included patients had a primary pulmonary—as opposed to extrapulmonary—infection, as a cause of ARDS. Circulating extracellular DNA kinetics have been reported in patients with trauma and were associated with organ failure time course.³⁷ Stable extracellular DNA circulating concentrations have also been reported in ARDS patients.³⁸ However, no previous study has described neutrophil extracellular trap kinetics in the bronchoalveolar compartment of ARDS patients. Our data show that neutrophil extracellular trap concentrations remained stable in the bronchoalveolar compartment over time, but the limited number of patients who had been sampled at the two time points precluded further exploring this aspect.

In our study, ARDS patients having higher bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations had the same severity of illness after intubation than others. Yet, they were less hypoxemic on day 1 (i.e., upon bronchoalveolar lavage fluid sampling) and eventually had a shorter duration of mechanical ventilation and of intensive care unit stay than others. However, no significant association was eventually demonstrated between bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations and the number of live ventilator-free days at day 28, even after accounting for clinically relevant potential confounders (i.e., $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio and tidal volume) in an exploratory multiple regression analysis. Importantly, our results do not support the hypothesis of a predominant detrimental role of neutrophil extracellular traps during ARDS, but would instead suggest that neutrophil extracellular traps might be beneficial during early pneumonia-associated ARDS. Such protective effect, if it were confirmed by further studies, could be consistent with the known antimicrobial effects of neutrophil extracellular traps, which have been previously shown to trap and kill a variety of pathogens including *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*.^{10,39} Conversely, patients experiencing chronic granulomatous disease, whose neutrophils fail to produce radical oxygen species-dependent neutrophil extracellular traps, are exposed to severe recurrent infections.^{12,13} Whether, during the acute phase of infectious ARDS, neutrophil extracellular traps have predominant antimicrobial protective effects will need to be confirmed by further studies.⁴⁰ Yet, our

results suggest that targeting neutrophil extracellular traps as an adjuvant therapy in ARDS might be at risk in this setting. On the other hand, one must certainly keep in mind that the excess or persistence of neutrophil extracellular traps release was previously shown to be potentially injurious to host organs and cells, especially in pulmonary diseases,^{24,25,42} suggesting that a potential detrimental role of neutrophil extracellular traps in these settings should not be ruled out. Our results, together with the existing body of literature on neutrophil extracellular traps, illustrate that the mechanisms underlying their production and the boundaries between their beneficial and detrimental effects during disease states in general, and during ARDS in particular, are still to be unveiled. The recent experimental study of Lefrançois *et al.*²⁰ illustrated that a critical balance of neutrophil extracellular traps is required to prevent lung injury and maintain microbial control. Although complete peptidylarginine deiminase 4 deficiency in mice resulted in decreased bronchoalveolar and plasma neutrophil extracellular trap concentrations, together with lessened lung injury and increased bacterial load, mice with a partial peptidylarginine deiminase 4 deficiency showed lower lung injury scores and improved survival. Our study further illustrates in ARDS patients that the relationship between bronchoalveolar neutrophil extracellular traps and outcomes is equivocal. Further studies should be performed to explore the association between neutrophil extracellular traps kinetics and outcomes in infectious and noninfectious ARDS.

Our study certainly has a number of limitations: (1) This is a monocentric study including a homogeneous population of patients with pneumonia-related ARDS, thus limiting its external validity. (2) The number of patients in the cohort is relatively small and the study was not designed based on power calculations to observe differences between higher and lower bronchoalveolar lavage neutrophil extracellular traps groups, which certainly limited our ability to observe more outcome differences. We included a small number of control patients ($n = 4$) who underwent a bronchoscopy as part of routine care. However, the narrow distribution of bronchoalveolar lavage neutrophil extracellular traps and cytokines values obtained suggest this was a homogeneous group of patients with no obvious acute lung inflammation. (3) High concentrations of neutrophil extracellular traps that were above the detection range were replaced by the threshold value (*i.e.*, values less than 4 and greater than 1,000 arbitrary units), limiting our ability to study patients with extreme neutrophil extracellular trap concentrations. And (4) although we hypothesize that the association between neutrophil extracellular trap bronchoalveolar concentrations and time to ARDS resolution is likely to result from their antimicrobial effects, our study does not allow for such a causal inference to be drawn. The fact that we could not obtain samples at both time points for all patients limited our ability to study neutrophil extracellular trap kinetics.

Conclusion

During early pneumonia-related ARDS, bronchoalveolar neutrophil extracellular traps are correlated with regional neutrophils and interleukin-8 concentrations. Bronchoalveolar neutrophil extracellular trap concentrations were not associated with the number of live ventilator-free days at day 28. Better understanding of the boundaries between the beneficial and detrimental effects of neutrophil extracellular traps during ARDS is crucial before embarking on trials aiming at assessing the effects of antineutrophil extracellular trap strategies.

Acknowledgments

The authors thank the nurses of the medical intensive care unit of Henri Mondor Hospital for their assistance in sampling patients, Aline Alves, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France, for her help in processing bronchoalveolar lavage fluid samples, and Jeanne Tran Van Nhieu, M.D. Hôpital Henri Mondor, Créteil, France, for performing bronchoalveolar lavage fluid cytological analyses, Florence Canoui-Poitrine, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France, for assistance in statistical analyses, and Dominique de Prost, M.D., Ph.D., Hôpital Louis Mourier, Colombes, France, for the constructive discussions on neutrophil extracellular traps.

Research Support

Support for this study was provided by 2013 Clinical Research Grant and 2016 Master 2 grant of the French Intensive Care Society (Société de Réanimation de Langue Française), Paris, France.

Competing Interests

The authors declare no competing interests.

Correspondence

Address correspondence to Dr. de Prost: Service de Réanimation Médicale, Hôpital Henri Mondor, 51, Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil Cedex, France. nicolas.de-prost@aphp.fr. This article may be accessed for personal use at no charge through the Journal Web site, www.anesthesiology.org.

References

1. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, Gattinoni L, van Haren F, Larson A, McAuley DF, Ranieri M, Rubenfeld G, Thompson BT, Wrigger H, Slutsky AS, Pesenti A; LUNG SAFE Investigators; ESICM Trials Group: Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute

- respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. *JAMA* 2016; 315:788–800
2. Acute Respiratory Distress Syndrome Network, Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342:1301–8
 3. The National Heart Lung, Network BIARDS (ARDS) CT: Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2006; 354:1671–84
 4. Perkins GD, McAuley DF, Thickett DR, Gao F: The beta-agonist lung injury trial (BALTI): A randomized placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:281–7
 5. McAuley DF, Laffey JG, O’Kane CM, Perkins GD, Mullan B, Trinder TJ, Johnston P, Hopkins PA, Johnston AJ, McDowell C, McNally C; HARP-2 Investigators; Irish Critical Care Trials Group: Simvastatin in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2014; 371:1695–703
 6. Abraham E: Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 2003; 31(4 Suppl):S195–9
 7. Williams AE, Chambers RC: The mercurial nature of neutrophils: Still an enigma in ARDS? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 306:L217–30
 8. Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J: Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:L1137–45
 9. Azoulay E, Darmon M, Delclaux C, Fieux F, Bornstain C, Moreau D, Attalah H, Le Gall JR, Schlemmer B: Deterioration of previous acute lung injury during neutropenia recovery. *Crit Care Med* 2002; 30:781–6
 10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303:1532–5
 11. Papayannopoulos V: Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2018; 18:134–47
 12. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A: Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176:231–41
 13. Bianchi M, Hakkin A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, Reichenbach J: Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 2009; 114:2619–22
 14. Bianchi M, Niemiec M, Siler U, Urban CF, Reichenbach J: Restoration of anti-Aspergillus defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:1243–52. e7
 15. Uchiyama S, Andreoni F, Schuepbach RA, Nizet V, Zinkernagel AS: DNase Sda1 allows invasive M1T1 Group A Streptococcus to prevent TLR9-dependent recognition. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002736
 16. Berends ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Köckritz-Blickwede M: Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* 2010; 2:576–86
 17. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT: Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009; 15:1318–21
 18. Saffarzadeh M, Jueneemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT: Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS One* 2012; 7:e32366
 19. Yildiz C, Palaniyar N, Otulakowski G, Khan MA, Post M, Kuebler WM, Tanswell K, Belcastro R, Masood A, Engelberts D, Kavanagh BP: Mechanical ventilation induces neutrophil extracellular trap formation. *ANESTHESIOLOGY* 2015; 122:864–75
 20. Lefrançois E, Mallavia B, Zhuo H, Calfee CS, Looney MR: Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. *JCI Insight* 2018; 3: pii: 98178. doi: 10.1172/jci.insight.98178. [Epub ahead of print]
 21. Li H, Zhou X, Tan H, Hu Y, Zhang L, Liu S, Dai M, Li Y, Li Q, Mao Z, Pan P, Su X, Hu C: Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS. *Oncotarget* 2018; 9:1772–84
 22. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS: Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin definition. *JAMA* 2012; 307:2526–33
 23. Mercat A, Richard JC, Vielle B, Jaber S, Osman D, Diehl JL, Lefrant JY, Prat G, Richecoeur J, Nieszkowska A, Gervais C, Baudot J, Bouadma L, Brochard L; Expiratory Pressure (Express) Study Group: Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: A randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299:646–55
 24. Papazian L, Forel JM, Gacouin A, Penot-Ragon C, Perrin G, Loundou A, Jaber S, Arnal JM, Perez D, Seghboyan JM, Constantin JM, Courant P, Lefrant JY, Guérin C, Prat G, Morange S, Roch A; ACURASYS Study Investigators: Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2010; 363:1107–16
 25. Griffiths MJ, Evans TW: Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N Engl J Med* 2005; 353:2683–95
 26. Guérin C, Reigner J, Richard JC, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, Mercier E, Badet M, Mercat A, Baudin

- O, Clavel M, Chatellier D, Jaber S, Rosselli S, Mancebo J, Sirodot M, Hilbert G, Bengler C, Richecoeur J, Gannier M, Bayle F, Bourdin G, Leray V, Girard R, Baboi L, Ayzac L; PROSEVA Study Group: Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2013; 368:2159–68
27. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, Brochard L, Brower R, Esteban A, Gattinoni L, Rhodes A, Slutsky AS, Vincent JL, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ranieri VM: The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med* 2012; 38:1573–82
 28. Bouadma L, Mourvillier B, Deiler V, Le Corre B, Lolom I, Régnier B, Wolff M, Lucet JC: A multifaceted program to prevent ventilator-associated pneumonia: impact on compliance with preventive measures. *Crit Care Med* 2010; 38:789–96
 29. Mekontso Dessap A, Katsahian S, Roche-Campo E, Varet H, Kouatchet A, Tomacic V, Beduneau G, Sonnevillier R, Jaber S, Dartmon M, Castanares-Zapatero D, Brochard L, Brun-Buisson C: Ventilator-associated pneumonia during weaning from mechanical ventilation: Role of fluid management. *Chest* 2014; 146:58–65
 30. Granger V, Faille D, Marani V, Noël B, Gallais Y, Szely N, Flament H, Pallardy M, Chollet-Martin S, de Chaisemartin L: Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J Leukoc Biol* 2017; 102:775–81
 31. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF: Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 2006; 368:157–69
 32. García-Laorden MI, Lorente JA, Flores C, Slutsky AS, Villar J: Biomarkers for the acute respiratory distress syndrome: How to make the diagnosis more precise. *Ann Transl Med* 2017; 5:283
 33. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR: An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:720–3
 34. Moorthy AN, Rai P, Jiao H, Wang S, Tan KB, Qin L, Watanabe H, Zhang Y, Teluguakula N, Chow VT: Capsules of virulent pneumococcal serotypes enhance formation of neutrophil extracellular traps during *in vivo* pathogenesis of pneumonia. *Oncotarget* 2016; 7:19327–40
 35. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WF, Liew AA, Phoon MC, van Rooijen N, Chow VT: Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol* 2011; 179:199–210
 36. Alfaro C, Teixeira A, Oñate C, Pérez G, Sanmamed MF, Andueza MP, Alignedani D, Labiano S, Azpilikueta A, Rodriguez-Paulete A, Garasa S, Fusco JB, Aznar A, Inogés S, De Pizzol M, Allegretti M, Medina-Echeverez J, Berraondo P, Perez-Gracia JL, Melero I: Tumor-produced interleukin-8 attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of neutrophil extracellular traps (NETs). *Clin Cancer Res* 2016; 22:3924–36
 37. Margraf S, Lögters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J: Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): A potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock* 2008; 30:352–8
 38. Espinasse MA, Hajage D, Montravers P, Piednoir P, Dufour G, Tubach F, Granger V, de Chaisemartin L, Noël B, Pallardy M, Chollet-Martin S, Biola-Vidamment A: Neutrophil expression of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) anti-inflammatory protein is associated with acute respiratory distress syndrome severity. *Ann Intensive Care* 2016; 6:105
 39. Lögters T, Paunel-Görgülü A, Zilkens C, Altrichter J, Scholz M, Thelen S, Krauspe R, Margraf S, Jeri T, Windolf J, Jäger M: Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. *J Orthop Res* 2009; 27:1401–7
 40. Müller-Redetzky H: Targeting neutrophil extracellular traps in acute lung injury: A novel therapeutic approach in acute respiratory distress syndrome? *ANESTHESIOLOGY* 2015; 122:725–7
 41. Liu S, Su X, Pan P, Zhang L, Hu Y, Tan H, Wu D, Liu B, Li H, Li H, Li Y, Dai M, Li Y, Hu C, Tsung A: Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. *Sci Rep* 2016; 6:37252. doi: 10.1038/srep37252
 42. Bosmann M, Grailer JJ, Ruemmler R, Russkamp NF, Zetouni FS, Sarma JV, Standiford TJ, Ward PA: Extracellular histones are essential effectors of C5aR- and C5L2-mediated tissue damage and inflammation in acute lung injury. *FASEB J* 2013; 27:5010–21

Understanding the Role of Neutrophil Extracellular Traps in Patients With Severe Pneumonia and ARDS



To the Editor:

We read with great interest the recently published *CHEST* article (October 2019) by Twaddell et al,¹ which comprehensively reviewed the role of neutrophil extracellular traps (NETs) in respiratory diseases. As nicely depicted by the authors, NET release by neutrophils during a process termed NETosis has been shown to be associated with positive outcomes, including extracellular pathogens trapping and killing,

and potentially negative ones, associated with tissue injury. Better delineating the roles of NETs in the pathophysiology of ARDS is of utmost importance because NETs could be potential therapeutic targets. However, as illustrated in Table 1, the currently available evidence supporting the hypothesis that the detrimental effects of NETs exceed their protective effects in clinical, as opposed to experimental, ARDS is scarce. Indeed, the four published clinical studies assessing the relationship between NET levels and outcomes show a wide heterogeneity regarding (1) the case mix of patients included, with one study including 310 patients with pneumonia and no ARDS,² one study including mainly patients with trauma-related ARDS,³ and two studies including patients with infection-related ARDS,^{4,5} reporting mortality rates ranging from 4% to 28%; (2) the methods used for measuring NET concentrations (DNA-myeloperoxidase or DNA-elastase complexes, cell-free DNA, and cell-free nucleosomes), where important differences render the comparison of the studies and the generalizability of their findings difficult; (3) the compartment (alveolar vs blood) in which NET measurements were performed; (4) the delay between ARDS onset and NET sampling; and (5) the clinical end points used (development of ARDS,⁴ ventilator-acquired pneumonia,³ ventilator-free days at day 28,⁵ or hospital mortality³). The conclusions that can be drawn from these heterogeneous cohorts are therefore limited.

Because most interventions tested in ARDS did not show significant benefit on clinically relevant outcomes, we do agree with Twaddell et al¹ that targeting NET formation in patients with severe pneumonia and/or ARDS may be a promising therapeutic avenue. A significant body of experimental literature has now accumulated and suggests the potential interest of NET modulation during various acute lung injury models.¹ However, more clinical data need to be accumulated and a better understanding of the association between NET concentrations, measured both in serum and in BAL fluid, and well-selected patient-centered outcomes is required, using similar and standardized NET quantification techniques.

*Inès Bendib, MD
Créteil Cedex, France
Luc de Chaisemartin, PharmD, PhD
Paris, France*

TABLE 1] Clinical Studies Assessing the Relationship Between NETs Concentrations in Serum or BAL Fluid and Outcomes in Patients With ARDS

Study/Year	No. of Patients	Clinical Context	Mortality	NET Quantification	Clinical Outcome	Study Limitations
Ebrahimi et al ² /2018	310	Community-acquired pneumonia Secondary analysis of a randomized controlled trial comparing prednisone vs placebo	4%	In serum: cell-free nucleosomes DNA-MPO DNA-elastase cell-free DNA	Serum levels of NETs associated with: - longer time to clinical stability and - increased adjusted OR of 30-d mortality	Cell-free nucleosomes are not 100% specific of NET formation Possible overestimation of cell-free nucleosomes No BAL fluid measurement performed Low mortality
Mikacenic et al ² /2018	100	Critically ill patients under MV with ARDS (n = 45) and/or VAP (n = 56)	25%	In BAL fluid: DNA-MPO BAL fluid cell-free DNA	- Higher DNA-MPO concentrations associated with increased risk of VAP - DNA-MPO and cell-free DNA concentrations associated with bacterial burden	Duration of MV before BAL sampling unknown No plasma NET measurements performed
Lefrançois et al ² /2018	144	Pneumonia- or sepsis-related ARDS (n = 104) and acute cardiac conditions (n = 40)	Not provided	In serum: DNA-elastase, DNase I	- Higher NET levels in patients with clinical infection-related ARDS vs patients with acute cardiac conditions - NET concentrations increased with ARDS severity and mortality - Low DNase I plasma concentration in patients with sepsis on initial presentation associated with development of ARDS	BAL fluid NETs concentrations not measured MPO-NET levels not measured
Bendib et al ² /2019	39	Pneumonia-related ARDS (n = 35) and control subjects (n = 4)	17%	In serum and BAL fluid: DNA-MPO	- Within 48 h of ARDS onset, BAL fluid levels of DNA-MPO were not significantly associated with ventilator-free days and mortality - Patients with ARDS had higher DNA-MPO levels than control subjects	Small number of patients

MPO = myeloperoxidase; MV = mechanical ventilation; NET = neutrophil extracellular trap.

Armand Mekontso Dessap, MD, PhD

Créteil Cedex, France

Sylvie Chollet-Martin, MD, PhD

Paris, France

Nicolas de Prost, MD, PhD

Créteil Cedex, France

AFFILIATIONS: From the Service de Réanimation Médicale (Drs Bendib, Dessap, and de Prost), DHU A-TV8, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; the Groupe de Recherche Clinique CARMAS (Drs Bendib, Dessap, and de Prost), Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris Est Créteil; the Laboratoire d'Immunologie "Autoimmunité et Hypersensibilités" (Drs de Chaisemartin and Chollet-Martin), Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; and the INSERM UMR996 (Drs de Chaisemartin and Chollet-Martin), Université Paris-Sud.

FINANCIAL/NONFINANCIAL DISCLOSURES: None declared.

FUNDING/SUPPORT: This study was funded by a 2013 Clinical Research Grant and 2016 Master 2 Grant from the French Intensive Care Society (Société de Réanimation de Langue Française).

ROLE OF SPONSORS: The sponsor had no role in the design of the study, the collection and analysis of the data, or the preparation of the manuscript.

CORRESPONDENCE TO: Nicolas de Prost, MD, PhD, Service de Réanimation Médicale, Hôpital Henri Mondor, 51, Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil Cedex, France; e-mail: nicolas.de-prost@aphp.fr

Copyright © 2019 American College of Chest Physicians. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.08.2179>

References

1. Twaddell SH, Baines KJ, Grainge C, Gibson PG. The emerging role of neutrophil extracellular traps in respiratory disease. *Chest*. 2019;156(4):774-782.
2. Ebrahimi F, Giaglis S, Hahn S, et al. Markers of neutrophil extracellular traps predict adverse outcome in community-acquired pneumonia: secondary analysis of a randomised controlled trial. *Eur Respir J*. 2018;51(4). pii: 1701589.
3. Mikacenic C, Moore R, Dmyterko V, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in the alveolar spaces of patients with ventilator-associated pneumonia. *Crit Care*. 2018;22(1):358.
4. Lefrançois E, Mallavia B, Zhuo H, Calfee CS, Looney MR. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. *ICI Insight*. 2018;3(3). pii: 98178.
5. Bendib I, Chaisemartin L de, Granger V, et al. Neutrophil extracellular traps are elevated in patients with pneumonia-related acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*. 2019;130(4):581-591.

Response



To the Editor:

We thank Bendib et al for their careful consideration of our article.¹ We agree, given the potential benefits of targeting neutrophil extracellular traps (NETs) in the treatment of various lung diseases, more work is needed to better delineate their fundamental roles. The lack of consistent clinical definition of these conditions in published trials, the relatively small number of clinical

studies, and the variation in timing in sampling from onset of symptoms only compounds the issue.

We also advocate the importance of measuring specific markers of NETs in the tissue or fluid of interest, such as BAL fluid in ARDS and assaying markers known to be related to specific histones and other nuclear components of NET forming neutrophils, such as myeloperoxidase-conjugated DNA, alpha defensins, or citrullinated histones. A correlation between serum NET levels and those seen in tissues and fluids has not yet been determined and given the complexity of the responses, we think it is likely to be highly variable.

As an example, serum and airway NET levels are variable in studies of asthma^{2,3} and COPD,⁴ and this is likely related to local factors such as release of chemotactic factors and tissue damage caused by proteases as part of the formation and action of NETs.

The question remains unanswered as to when NETs are beneficial and when they are harmful and how we can effectively target them to achieve best outcomes. Further clinical studies are required to better determine the circumstances that dictate behavior of NETs in respiratory diseases.

Scott H. Twaddell, BMed

Peter G. Gibson, DMed

New Lambton Heights, NSW, Australia

AFFILIATIONS: From the Department of Respiratory and Sleep Medicine and Hunter Medical Research Institute, John Hunter Hospital.

FINANCIAL/NONFINANCIAL DISCLOSURES: See earlier cited article for author conflicts of interest.

CORRESPONDENCE TO: Scott H. Twaddell, BMed, Department of Respiratory and Sleep Medicine, John Hunter Hospital and Hunter Medical Research Institute, Lookout Rd, New Lambton Heights, NSW, 2305, Australia; e-mail: scott.twaddell@health.nsw.gov.au
Copyright © 2019 American College of Chest Physicians. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.08.2178>

References

1. Twaddell SH, Baines KJ, Grainge C, Gibson PG. The emerging role of neutrophil extracellular traps in respiratory disease. *Chest*. 2019;156(4):774-782.
2. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology*. 2006;11(1):54-61.
3. Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Gibson PG. Systemic upregulation of neutrophil α -defensins and serine proteases in neutrophilic asthma. *Thorax*. 2011;66(11):942-947.
4. Wright TK, Gibson PG, Simpson JL, McDonald VM, Wood LG, Baines KJ. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology*. 2016;21(3):467-475.

2. Article 2: Alveolar compartmentalization of inflammatory and immune cell biomarkers in pneumonia-related ARDS

Inès Bendib ; Asma Beldi-Ferchiou ; Frédéric Schlemmer ; Mathieu Surenaud ; Bernard Maitre ; Anne Plonquet ; Guillaume Carteaux ; Keyvan Razazi ; Véronique Godot ; Sophie Hüe ; Armand Mekontso Dessap and Nicolas de Prost.

Crit Care 2021 25(1):23.

Alors que le sang a été l'échantillon biologique le plus couramment utilisé pour rechercher des biomarqueurs candidats, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est l'échantillon le plus proche du site de l'agression et reflète plus précisément l'environnement pulmonaire local [36]. En fait, aucun biomarqueur unique obtenu à partir d'échantillons sanguins n'a été démontré comme étant systématiquement pronostique dans une récente revue systématique [48]. Cette absence d'association peut être due à une compartimentation alvéolaire des biomarqueurs au cours du SDRA lié à la pneumonie. Dans ce contexte, mieux comprendre l'interaction des biomarqueurs du SDRA entre les compartiments alvéolaire et sanguin semble une étape critique pour fournir de nouvelles informations sur sa pathogenèse. Pour ce faire, nous avons mené une cohorte prospective monocentrique de patients immunocompétents atteints de SDRA associé à une pneumonie modérée à sévère (hors infection à SARS-CoV-2), avec les objectifs : (1) d'étudier l'interrelation des biomarqueurs entre les compartiments alvéolaires et sanguins, et (2) d'explorer leur association avec le pronostic.

Les concentrations de 22 biomarqueurs étaient mesurées dans le LBA et le sérum par technique Luminex® et l'expression d'HLA-DR et de PD-1 sur les monocytes et lymphocytes CD8+ alvéolaires et sanguins était quantifiée par cytométrie en flux. Soixante-dix patients étaient inclus dans la cohorte, et leur mortalité hospitalière était de 21,4%. L'IL-8 était la cytokine la plus compartimentée avec un rapport de concentrations LBA/sérum moyen de 20. Les patients SDRA présentant un état de choc avaient des rapports LBA/sérum plus bas pour IL-1Ra, l'IL-6, IP-10/CXCL10 et l'IL-10, témoignant d'une décompartimentalisation de la concentration de ces cytokines entre les compartiments alvéolaires et sanguin (**Figure 2** de l'article). Un rapport LBA/sérum bas d'IL-1Ra était associé à la mortalité hospitalière, après ajustement sur le score SOFA et la pression motrice (**Table 2** de l'article). En revanche, ni

l'expression d'HLA-DR monocytaire alvéolaire ni l'expression de PD-1 par les lymphocytes T CD8+, ni le rapport de leur expression entre les compartiments alvéolaires et sanguins, n'étaient pronostiques de la mortalité hospitalière (**Tables S4 et S5** du supplément, **pages 198 et 200 du manuscrit**).

RESEARCH

Open Access



Alveolar compartmentalization of inflammatory and immune cell biomarkers in pneumonia-related ARDS

Inès Bendib^{1,2,6}, Asma Beldi-Ferchou^{3,4}, Frédéric Schlemmer⁵, Mathieu Surenaud³, Bernard Maitre⁵, Anne Plonquet⁴, Guillaume Carteaux^{1,2}, Keyvan Razazi^{1,2}, Veronique Godot^{6,7,8}, Sophie Hüe^{3,4}, Armand Mekontso Dessap^{1,2,9} and Nicolas de Prost^{1,2*}

Abstract

Background: Biomarkers of disease severity might help individualizing the management of patients with the acute respiratory distress syndrome (ARDS). Whether the alveolar compartmentalization of biomarkers has a clinical significance in patients with pneumonia-related ARDS is unknown. This study aimed at assessing the interrelation of ARDS/sepsis biomarkers in the alveolar and blood compartments and explored their association with clinical outcomes.

Methods: Immunocompetent patients with pneumonia-related ARDS admitted between 2014 and 2018 were included in a prospective monocentric study. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and blood samples were obtained within 48 h of admission. Twenty-two biomarkers were quantified in BAL fluid and serum. HLA-DR⁺ monocytes and CD8⁺ PD-1⁺ lymphocytes were quantified using flow cytometry. The primary clinical endpoint of the study was hospital mortality. Patients undergoing a bronchoscopy as part of routine care were included as controls.

Results: Seventy ARDS patients were included. Hospital mortality was 21.4%. The BAL fluid-to-serum ratio of IL-8 was 20 times higher in ARDS patients than in controls ($p < 0.0001$). ARDS patients with shock had lower BAL fluid-to-serum ratio of IL-1Ra ($p = 0.026$), IL-6 ($p = 0.002$), IP-10/CXCL10 ($p = 0.024$) and IL-10 ($p = 0.023$) than others. The BAL fluid-to-serum ratio of IL-1Ra was more elevated in hospital survivors than decedents ($p = 0.006$), even after adjusting for SOFA and driving pressure ($p = 0.036$). There was no significant association between alveolar or alveolar/blood monocytic HLA-DR or CD8⁺ lymphocytes PD-1 expression and hospital mortality.

Conclusions: IL-8 was the most compartmentalized cytokine and lower BAL fluid-to-serum concentration ratios of IL-1Ra were associated with hospital mortality in patients with pneumonia-associated ARDS.

Keywords: Respiratory distress syndrome, Adult, Pneumonia, Cytokines, HLA-DR antigens, PD-1

Background

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) is the most severe form of acute hypoxemic respiratory failure and affects 10% of all intensive care unit

(ICU) patients. Despite advances in patient management during the previous decades, hospital mortality of ARDS remains as high as 40% [1]. As most pharmacological interventions tested in ARDS yielded disappointing results [2–4], the identification of biomarkers of disease severity that would be potential therapeutic targets or allow for individualizing patient management has become a major area of research. Indeed, combining plasma biomarkers and clinical variables

*Correspondence: nicolas.de-prost@aphp.fr

¹ Service de Médecine Intensive Réanimation, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 51, Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil Cedex, France
Full list of author information is available at the end of the article



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

has been shown to improve mortality prediction in ARDS patients [5] and allowed for identifying subphenotypes with different clinical outcomes and therapeutic intervention responses [6, 7]. While blood has been the most common biological sample used to search candidate biomarkers, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid is the closest sample to the site of injury and more accurately reflects the local lung environment [8], as illustrated by a pioneer study that identified BAL fluid—but not plasma—levels of IL-8 to predict ARDS development in at-risk patients [9]. In fact, no single biomarker obtained from blood samples has been shown to be consistently associated with outcomes in a recent systematic review [10]. This lack of association may be due to an alveolar compartmentalization of biomarkers during pneumonia-related ARDS.

Pulmonary infections account for the vast majority of ARDS risk factors [11] and are associated with septic shock in about 70% of cases. In patients with septic shock, a sustained decrease in HLA-DR expression on circulating monocytes [12, 13] was consistently associated with an increased risk of nosocomial infections [14] and a higher risk of death [14–16]. Programmed death receptor-1 (PD-1) is an inhibitory immune checkpoint receptor expressed on activated lymphocytes and myeloid cells, which participates to immune tolerance maintain [17]. Preclinical experiments using ARDS [18] models showed a survival benefit of PD-1 pathway inhibition, suggesting that PD-1 expression on immune cells could be an outcome biomarker in patients with sepsis [19–21] and ARDS [18]. Sepsis-induced defects in innate and adaptive immune cells were not only observed in blood but also in the lungs of patients dying from sepsis, illustrating that such immune alterations also occurred *in situ*, although the clinical significance of such regional alterations has not been established [22]. Monitoring blood monocyte HLA-DR expression has been previously used to guide targeted immunological interventions [23–25] and it has been speculated that the quantification of HLA-DR on alveolar monocytes [26] may enrich the identification of patients who might benefit from immunomodulatory interventions [16, 27, 28].

Better understanding the interplay of ARDS biomarkers between the alveolar and blood compartments seems a critical step to provide new insights into pathogenesis. In the current study, we aimed to assess in a prospective cohort of patients with moderate to severe pneumonia-associated ARDS: (1) the interrelation of ARDS/sepsis biomarkers in the alveolar and blood compartments, and (2) explore their association with clinical outcomes.

Material and methods

Study design

This prospective single-center observational cohort study was approved by the institutional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France V, Paris, France, #13899). Consecutive patients diagnosed with pneumonia-related ARDS admitted to the medical ICU of Henri Mondor Hospital, Créteil, France, from January 2014 to December 2018 were eligible for inclusion in the study. Informed consent was obtained from all included patients or their relatives.

Patients and data collection

All patients with moderate/severe pneumonia-related ARDS [11] were included consecutively with the following inclusion criteria: tracheal intubation and mechanical ventilation since less than 48 h; pulmonary infection diagnosed less than 7 days before ICU admission; bilateral pulmonary infiltrates on chest X-ray; a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio ≤ 200 mmHg with a positive end-expiratory pressure (PEEP) ≥ 5 cm H_2O . Non-inclusion criteria were as follows: age < 18 years; pregnancy; chronic respiratory failure requiring long-term oxygen therapy; Child–Pugh C liver cirrhosis; lung fibrosis; immunosuppression, SAPS II (Simplified Acute Physiology II score) > 90 , irreversible neurological disorders, patients with withholding/withdrawing of life-sustaining therapies and profound hypoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 75$ mmHg).

Control patients (i.e., non-mechanically ventilated patients free of ARDS or immunosuppression; $n = 7$) undergoing a bronchoscopy with bronchoalveolar lavage (BAL) and blood sampling as part of routine care were also included (Additional file 1: Table S1). None of the controls was receiving antibiotics at the time of BAL fluid and blood sampling.

Demographics, clinical and laboratory variables upon ICU admission, at samples collection time points and during ICU stay were prospectively collected. The initial severity of ARDS patients was assessed using the SAPS II [29] and the sequential organ failure assessment (SOFA) scores. Other variables included the use of adjuvant therapies for ARDS (i.e., neuromuscular blocking agents, nitric oxide inhalation, prone positioning, extracorporeal membrane oxygenation), the need for hemodialysis or vasopressors, the administration of corticosteroids, the number of ventilator- and organ failure-free days at day 28 and ICU mortality. The clinical endpoint of the study was hospital mortality.

ARDS patients received mechanical ventilation using a standardized protective ventilation strategy [30]. Other treatments, including neuromuscular blocking agents [31], nitric oxide inhalation [32], prone positioning [33]

and extra-corporeal membrane oxygenation were administered depending on the severity of ARDS [34]. The prevention of ventilator-associated pneumonia followed a multifaceted program [35]; Sedation and mechanical ventilation weaning followed standardized protocols [36].

BAL fluid and blood sampling

BAL fluid was collected and preserved undiluted from all ARDS patients during a bronchoscopy performed within 48 h of ARDS onset. BAL fluid samples were also collected from control patients. Concomitant blood samples were obtained in ARDS and control patients. During a standard flexible bronchoscopy, the bronchoscope was wedged within a bronchopulmonary segment. Four aliquots of normal saline (50 mL each) were instilled through the bronchoscope within the selected bronchopulmonary segment. After each aliquot was instilled, saline was retrieved using a negative suction pressure (BAL fluid return did not differ between ARDS patients and controls; median = 59 mL [first-third quartiles] [46–74] mL versus 80 mL [48–91], $p=0.40$). BAL samples were filtered through a 100 μ m cell strainer, centrifugated and BAL cells were then collected in phosphate buffered saline solution. BAL fluid cytology was performed by direct microscopy after centrifuging bronchoalveolar lavage fluid samples (12,000 revolutions for 10 min) and drying under the May–Grünwald–Giemsa staining. Total (quantified in cells/mL) and differential (i.e., percent of neutrophils, macrophages and lymphocytes) cell counts were measured as recommended [37].

Blood and BAL fluid samples were shipped at room temperature to the cytometry platform and analyzed within two hours. BAL fluid and blood samples were centrifuged and supernatants were stored at -80°C for subsequent analyses.

Flow cytometry analysis

Blood and BAL fluid immuno-staining were performed as follows: 100 μ L of whole blood or BAL fluid were incubated for 10 min at room temperature in the dark with the following conjugated-monoclonal antibodies: anti-CD3-AA750, anti-CD8-AA700, anti-CD279 (PD-1)-PC7 or isotype control, anti-HLA-DR-PB or isotype control, anti-CD14-ECD and CD45-Krome Orange (Beckman Coulter). For blood samples, red-blood cells were then lysed using VersaLyse Solution (Beckman Coulter). Washed blood and BAL fluid-stained samples were immediately acquired on a 10-multicolor Navios flow cytometer and analyzed with the Kaluza 2.1 software (both from Beckman Coulter). The gating strategy is depicted in Additional file 1: Figure S1 in BAL fluid (Panel A) and blood (Panel B). HLA-DR and PD-1

quantification were expressed in percentage of positive cells or mean fluorescence of intensity (MFI).

Inflammation and endothelium/alveolar epithelium injury biomarkers quantification in BAL fluid supernatant

Cytokines were measured at distance using Luminex[®] multiplex bead-based technology (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and a Bio-Plex 200[®] instrument (BioRad, Hercules, CA, USA), according to the manufacturers' protocols. BAL fluid concentrations of 22 biomarkers, including inflammatory markers and cytokines/chemokines (interleukin (IL)-1Ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12/23p40, IL-13, IL-17A, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), RANTES, CXCL10, Serpin E1), endothelial injury (intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), von Willebrand Factor (vWF), angiotensin (Ang)-1/2) and alveolar epithelium injury (receptor for advanced glycation end products (RAGE), surfactant protein (SP)-D, amphiregulin) biomarkers, were quantified in BAL fluid supernatant and serum and expressed in fluorescence intensities and concentrations (pg/mL).

Data presentation and statistical analysis

Continuous variables are reported as median [1st–3rd quartiles] or mean \pm standard deviation (SD), and compared using the unpaired Student *t* test or the Mann–Whitney test, as appropriate. Comparison of paired quantitative variables was performed using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test or two-way ANOVA with repeated measures when more than two groups were compared. Correlations between continuous variables were assessed using the Spearman method. Qualitative variables are expressed as numbers and percentages and compared with the Chi² or Fischer tests, as recommended. Uni- and multivariable logistic regression models were used to assess the relationship between BAL fluid-to-serum concentration ratios of biomarkers, BAL fluid-to-blood ratio of monocytic HLA-DR or T CD8⁺ lymphocyte PD-1 expression, as continuous variables, and hospital mortality (dependent variable). Adjusted analyses were performed including major prognostic variables defined a priori (i.e., SOFA score [38] and driving pressure [39]). No imputation of missing variable was performed. A *p* value <0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 8.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and R 3.1.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Initial presentation and outcomes of patients with pneumonia-related ARDS

One hundred and eighty-eight patients with moderate-to-severe pneumonia-related ARDS were admitted to the ICU during the four-year study period, of whom 118 had non-inclusion criteria and 70 were included in the study (Additional file 1: Figure S2). A microbiological documentation was obtained in 87% ($n=61/70$) of included patients, 67% ($n=47/70$) of whom had bacterial infections, and 26% ($n=18/70$) had viral infections (four had bacterial and viral coinfections) (Additional file 1: Table S2). The comorbidities, clinical and biological characteristics of patients at ICU admission and at the time the first BAL was sampled (i.e., after a median delay of one day following intubation) are presented in Additional file 1: Table S1.

In-hospital mortality was 21.4% ($n=15/70$). Patients who were dead at hospital discharge did not exhibit more frequent ventilator-associated pneumonia episodes or septic shock during hospital stay but required more frequent renal replacement therapy than those who survived (Table 1).

Biomarkers in the bronchoalveolar lavage fluid and serum of patients with pneumonia-related ARDS

Biomarkers previously shown to be associated with key pathways involved in the pathophysiology of ARDS [8, 10] were quantified in BAL fluid and serum samples obtained in average one day after intubation and compared with those of controls. As expected, dramatically higher concentrations of these biomarkers were observed in ARDS patients (Additional file 1: Figures S3a and S3b). Significant positive correlations were observed between BAL fluid and serum concentrations for most of the studied biomarkers (Fig. 1a). In an attempt to assess the alveolar concentrations of these biomarkers relative to those of serum, we computed BAL fluid-to-serum concentration ratios (Figs. 2a, b). Strikingly, BAL fluid-to-serum ratios of most of the measured biomarkers yielded values close to 1 in ARDS and controls, indicating no concentration gradient between the alveolar and blood compartments, while values greater than one were observed for SP-D, IL-6, IL-8 and IP-10/CXCL10. Of note, the only cytokine that showed a significantly higher ratio in ARDS patients than in controls was IL-8 ($p < 0.0001$, Fig. 2a), with measured concentrations which were 20 times as high in BAL fluid than in serum. We further investigated whether patients who had septic shock at the time the biomarkers were drawn exhibited different BAL fluid-to-serum ratios than others. Interestingly, most of the cytokines involved in innate immunity (i.e., IL-1Ra, IL-6, IP-10/CXCL10 and

IL-10), together with Ang2, a biomarker of endothelial injury, showed significantly higher ratios in non-shocked versus shocked patients, indicating less alveolar compartmentalization of these biomarkers in shocked patients (Fig. 2b).

An exploratory analysis assessing the prognostic value of the BAL fluid-to-serum ratio of these biomarkers indicated that IL-10, IL-1Ra, amphiregulin and RAGE were significantly associated with hospital mortality (Table 2). Yet, the only biomarker whose BAL fluid-to-serum ratio remained significantly associated with mortality after adjusting for admission SOFA and driving pressure was IL-1Ra (Table 2). A comparison of the area under the curves of receiver operating characteristic curves for serum versus BAL fluid versus BAL fluid-to-serum ratio of IL-10, IL-1Ra, amphiregulin and RAGE and hospital mortality consistently showed that BAL fluid-to-serum ratios had the strongest association with hospital mortality, except for serum RAGE levels that showed the same prediction performances than did BAL fluid-to-serum ratios (Additional file 1: Figure S4). Raw BAL fluid and serum biomarkers concentrations in survivors and decedents are shown in Additional file 1: Table S3.

Cell surface biomarkers on bronchoalveolar and blood leukocytes of patients with pneumonia-related ARDS

As expected in pneumonia-related ARDS, BAL fluid cellularity was elevated (median: 470×10^3 cells/mL [227–975]) and differential cell counts showed a majority of neutrophils (69% [38–84], Table 1), consistent with alveolar inflammation.

We quantified the monocytic expression of HLA-DR, a prognostic cell surface biomarker in septic shock patients [15], on bronchoalveolar and circulating monocytes, within 48 h of tracheal intubation. As compared with control patients, those with pneumonia-related ARDS exhibited significantly lower HLA-DR expression, both on circulating ($p < 0.0001$ when expressed in percentage of positive cells; Fig. 3a) and alveolar ($p < 0.0001$ when expressed in MFI; Fig. 3b) monocytes. ARDS patients also displayed dramatically higher HLA-DR expression, expressed both in percentage of positive cells ($p < 0.0001$; Fig. 3a) and MFI ($p < 0.0001$; Fig. 3b), on their alveolar than on their blood monocytes, consistent with the recruitment of activated monocytes in the infected lungs. Of note, there was a significant positive correlation between HLA-DR expression on circulating and on alveolar monocytes (Fig. 1b). The BAL fluid-to-blood ratio of HLA-DR monocytic expression was computed so that to better assess the compartmentalization of this biomarker during pneumonia-associated ARDS: when expressed in percentage of HLA-DR positive monocytes, the ratio was higher in ARDS patients than in controls. We also

Table 1 Characteristics and outcomes of patients with pneumonia-associated acute respiratory distress syndrome (n = 70) who survived (n = 55) to hospital discharge or not (n = 15)

Variables	Available data	Survived N = 55	Died N = 15	p value
<i>Demographics and comorbidities</i>				
Age	70	59 [51–69]	70 [57–79]	0.197
Gender, male	70	38 (69)	12 (80)	0.407
BMI, kg/cm ²	70	27.3 [23.7–31.8]	26.4 [23.7–28.0]	0.440
Diabetes mellitus	70	16 (29)	3 (20)	0.483
COPD	70	10 (18)	3 (20)	0.872
Chronic heart failure	70	10 (18)	3 (20)	0.872
Liver cirrhosis	70	3 (5)	0 (0)	0.355
Smoker	70	24 (44)	8 (53)	0.504
<i>Patients characteristics upon ICU admission</i>				
SOFA	70	9 [7–10]	12 [5–14]	0.142
SAPS II	70	43 [31–55]	53 [41–62]	0.165
Admission-intubation ^a , days	70	0.0 [0.0–1.0]	0.0 [0.0–1.0]	0.961
Number of ARDS risk factors	70	1 [1–2]	1 [1–1]	0.239
Temperature	70	38.5 [38.0–39.1]	38.2 [37.5–39.5]	0.492
ARDS severity (Berlin)	70			0.719
Mild		2 (4)	0 (0)	
Moderate		20 (36)	5 (33)	
Severe		33 (60)	10 (67)	
Driving pressure, cmH ₂ O	70	14 [12–17]	16 [13–20]	0.240
Cr _i , mL/cmH ₂ O	70	26 [23–34]	28 [21–33]	0.901
Lung injury score	70	2.5 [2.2–3.0]	2.2 [2.0–2.7]	0.418
PEEP, cmH ₂ O	70	10 [6–12]	8 [5–10]	0.162
Tidal volume, mL/kg of PBW	70	6.1 [5.8–6.5]	6.3 [6.0–6.9]	0.642
PaO ₂ /FIO ₂ ratio, mmHg	70	92 [73–139]	91 [73–188]	0.858
Paco ₂ , mmHg	70	46 [40–51]	50 [33–59]	0.858
pH	70	7.34 [7.27–7.42]	7.30 [7.25–7.35]	0.261
Arterial blood lactates, mM	70	1.5 [1.0–2.5]	1.9 [1.0–3.7]	0.410
Creatinine, μmol/L	70	85 [68–149]	130 [81–234]	0.119
Bilirubin, μmol/L	70	11 [6–18]	19 [12–58]	0.008
Prothrombin time, %	70	76 [64–84]	60 [42–74]	0.018
WBC counts, 10 ³ /mm ³	70	11.7 [8.0–19.5]	13.8 [8.3–18.6]	0.949
Neuromuscular blockers	70	40 (73)	12 (80)	0.568
Prone position	70	20 (36)	3 (20)	0.232
ECMO	70	2 (4)	1 (7)	0.607
Shock ^b	70	14 (25)	7 (47)	0.112
<i>Patients characteristics upon BAL 1 sampling</i>				
SOFA	70	8 [6–10]	11 [7–13]	0.083
Intubation-BAL 1 ^c , days	70	1.0 [1.0–1.0]	1.0 [1.0–1.0]	0.868
BAL cells, 10 ³ /mL	70	415 [224–962]	565 [250–1700]	0.657
BAL macrophages, %	70	25 [12–49]	26 [8–51]	0.775
BAL lymphocytes, %	70	3 [1–6]	5 [1–9]	0.530
BAL neutrophils, %	70	69 [38–83]	72 [38–90]	0.616
Driving pressure, cmH ₂ O	70	12 [10–14]	15 [12–17]	0.030
Cr _i , mL/cmH ₂ O	70	33 [26–42]	32 [22–40]	0.371
Lung injury score	70	2.5 [2.2–3.0]	2.2 [2.0–2.7]	0.418
PEEP, cmH ₂ O	70	10 [8–14]	8 [5–10]	0.018
Tidal volume, mL/kg of PBW	70	6.1 [5.8–6.5]	6.1 [5.8–6.3]	0.647

Table 1 (continued)

Variables	Available data	Survived N=55	Died N=15	p value
PaO ₂ /FiO ₂ ratio, mmHg	70	168 [116–241]	138 [117–238]	0.457
PaCO ₂ , mmHg	70	44 [38–47]	42 [38–57]	0.931
pH	70	7.39 [7.32–7.44]	7.35 [7.26–7.40]	0.127
Arterial blood lactates, mM	70	1.3 [0.8–2.0]	1.5 [1.2–2.7]	0.175
Creatinine, μmol/L	70	91 [65–166]	179 [91–255]	0.009
Bilirubin, μmol/L	70	11 [7–19]	21 [11–48]	0.029
Prothrombin time, %	70	73 [61–80]	51 [40–66]	0.007
Platelets, 10 ⁹ /mm ³	70	198 [149–268]	189 [130–238]	0.229
WBC counts, 10 ⁹ /mm ³	70	10.7 [8.6–19.7]	15.5 [10.3–20.6]	0.383
Lymphocytes, 10 ⁹ /mm ³	62	0.8 [0.6–1.2]	1.0 [0.6–2.1]	0.366
Monocytes, 10 ⁹ /mm ³	62	0.5 [0.3–1.0]	0.5 [0.2–1.4]	0.908
Neutrophils, 10 ⁹ /mm ³	62	9.1 [7.0–17.1]	13.2 [9.8–15.3]	0.539
Neuromuscular blockers	70	36 (65)	11 (73)	0.565
Prone position	70	22 (40)	3 (20)	0.152
ECMO	70	3 (5)	3 (20)	0.074
Shock ^c	70	12 (22)	7 (47)	0.055
Outcomes				
VAP	70	17 (31)	5 (33)	> 0.99
Viral reactivation	70	9 (16)	5 (33)	0.161
CMV		2 (4)	1 (7)	0.521
HSV		7 (13)	4 (29)	0.215
Shock dose steroids	70	17 (31)	7 (47)	0.254
Shock ^d	70	39 (71)	9 (60)	0.420
Renal replacement therapy	70	14 (25)	9 (60)	0.012
ECMO	70	4 (7)	4 (27)	0.058
MV duration, days	70	8 [5–20]	9 [4–30]	0.662
MV free days at day 28, days	70	20 [11–23]	0 [0–0]	< 0.0001
ICU length of stay, days	70	16 [9–25]	10 [5–33]	0.226
Hospital length of stay, days	70	24 [13–51]	10 [5–50]	0.075
ICU mortality	70	0 (0)	13 (87)	< 0.0001

ARDS acute respiratory distress syndrome, BAL bronchoalveolar lavage, BMI body mass index, CMV cytomegalovirus, COPD chronic obstructive pulmonary disease, Crs compliance of the respiratory system, VAP ventilator-acquired pneumonia, ECMO extracorporeal membrane oxygenation, HSV Herpes simplex virus, ICU intensive care unit, MV mechanical ventilation, PEEP positive end-expiratory pressure, PBW predicted body weight, SOFA sequential organ failure assessment, SAPS II simplified acute physiology score II, WBC white blood cell

Bolded p values are statistically significant ($p < 0.05$)

p values come from the Mann-Whitney test; categorical variables are shown as n (%); p values come from the Chi² or the Fisher exact test, as appropriate

^a Time elapsed between ICU admission and tracheal intubation

^b As defined by the Sepsis 3 definition

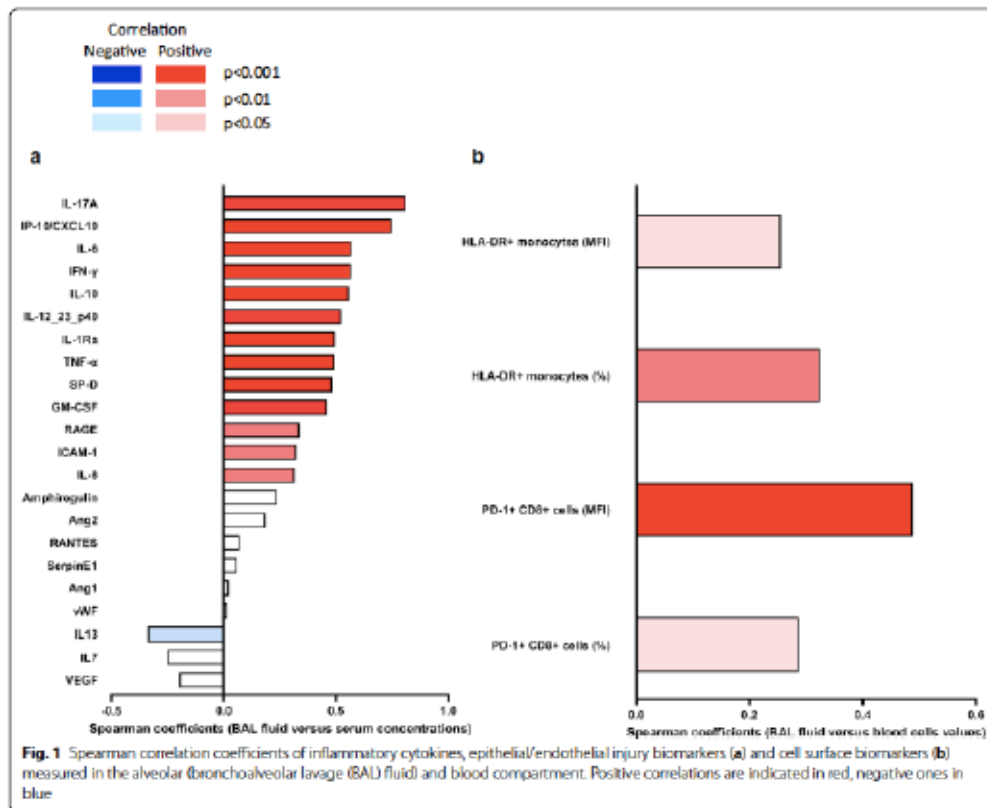
^c Time elapsed between tracheal intubation and sampling of the first bronchoalveolar lavage (BAL 1)

^d As defined by the Sepsis 3 definition; continuous variables are presented as median [1st–3rd quartiles]

compared this ratio between patients with and without septic shock, as HLA-DR monocytic expression is an outcome biomarker in this specific group of patients, and observed that it was lower in the former than in the latter (Fig. 2b).

There was no statistically significant association between HLA-DR expression on alveolar monocytes

and hospital mortality, even after adjusting for potentially confounding variables (i.e., SOFA score and driving pressure, Additional file 1: Table S4). There was also no significant relationship between the BAL fluid-to-blood ratio of HLA-DR monocytic expression and hospital mortality. There was a negative correlation between HLA-DR on alveolar monocytes and the SOFA score (Spearman $r = -0.42$; $p = 0.0003$).



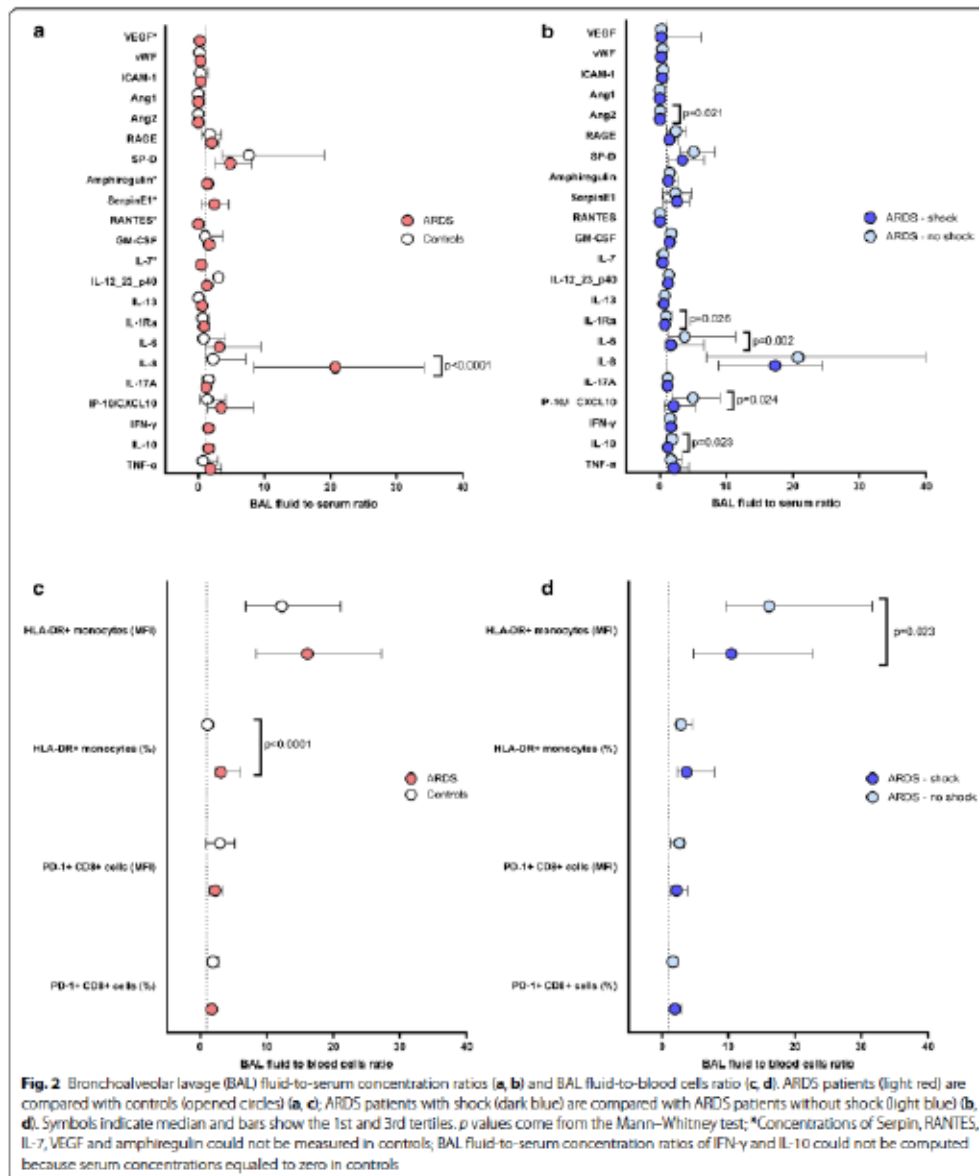
Patients with pneumonia-related ARDS exhibited significantly higher PD-1 expression on both alveolar ($p=0.001$) and blood ($p=0.022$) T CD8⁺ lymphocytes than did control patients. Among ARDS patients, a higher expression of PD-1 was also observed on alveolar than on blood T CD8⁺ lymphocytes ($p<0.0001$; Fig. 3c and $p=0.016$; Fig. 3d), consistent with the recruitment of activated CD8⁺ lymphocytes at the site of infection. There was no statistically significant association between PD-1 on alveolar T CD8⁺ lymphocytes or the BAL fluid-to-blood ratio of PD-1⁺ CD8⁺ cells (in percentage or MFI) and hospital mortality (Additional file 1: Table S5).

Discussion

The current study included 70 patients with pneumonia-related ARDS and quantified the concomitant concentration/cell surface expression of biomarkers in the bronchoalveolar and blood compartments. This was a

cohort of homogeneous immunocompetent patients, all diagnosed with moderate-to-severe ARDS since less than 48 h when included in the study. The main results of the current study are as follows: (1) IL-8 had the highest BAL fluid-to-serum concentration ratio and IL-1Ra, IL-6, IP-10/CXCL10 and IL-10 showed higher lung/blood concentration gradients in non-shocked than in shocked patients; (2) in an exploratory analysis, IL-1Ra were associated with hospital mortality after adjusting for major confounding variables defined a priori (i.e., SOFA and driving pressure); and (3) HLA-DR expression measured within 48 h of intubation on monocytes and PD-1 expression on T CD8⁺ lymphocytes showed a lung compartmentalization, but were not associated with hospital mortality.

The identification of reliable biomarkers constitutes a major area of research in ARDS to help predict its development, stratify disease severity into more accurate



phenotypes, provide new insights into its pathogenesis and monitor response to treatment [8]. Although improvements regarding patient phenotyping have

been made using multiparametric approaches combining clinical and biological variables [6, 7], no single biomarker obtained from blood samples has been shown to

Table 2 BAL fluid-to-serum concentration ratios of cytokines and epithelial/endothelial injury biomarkers in pneumonia-associated ARDS patients who survived ($n = 55$) to hospital discharge or not ($n = 15$)

	Survived ($n = 55$)	Died ($n = 15$)	Univariable analysis		Multivariable analysis	
			OR 95% CI	p value ^a	OR 95% CI	Adjusted p value ^b
TNF- α	1.78 [1.34–3.48]	2.17 [1.01–4.41]	0.96 [0.82–1.12]	0.612		–
IL-10	1.59 [1.13–2.39]	1.08 [0.75–0.55]	0.31 [0.11–0.87]	0.014	0.39 [0.14–1.09]	0.060
IFN- γ	1.53 [1.33–1.93]	1.39 [1.16–1.81]	0.78 [0.37–1.64]	0.310		–
IP-10/CXCL10	4.52 [1.73–9.52]	2.16 [0.76–4.97]	0.92 [0.81–1.04]	0.073		–
IL-17a	1.16 [1.05–1.29]	1.14 [1.07–1.21]	0.81 [0.40–1.65]	0.843		–
IL-8 CXCL8	20.96 [9.07–43.21]	11.57 [7.70–24.03]	0.97 [0.93–1.01]	0.163		–
IL-6	3.48 [1.10–10.16]	1.36 [0.61–4.72]	0.95 [0.86–1.04]	0.099		–
IL1-Ra	1.03 [0.55–1.82]	0.50 [0.29–0.72]	0.15 [0.03–0.72]	0.006	0.18 [0.04–0.88]	0.036
IL-13	0.61 [0.38–0.82]	0.57 [0.13–1.27]	0.83 [0.28–2.47]	0.805		–
SP-D	4.83 [2.57–8.55]	4.87 [1.42–6.50]	0.94 [0.82–1.07]	0.303		–
GM-CSF	1.60 [1.17–2.06]	1.50 [1.14–2.45]	1.33 [0.74–2.39]	0.899		–
Amphiregulin	1.48 [1.18–2.14]	1.13 [0.92–1.45]	0.31 [0.07–1.37]	0.037	0.44 [0.13–1.49]	0.129
IL12-23p40	1.34 [1.16–1.59]	1.15 [1.02–1.42]	0.64 [0.18–2.25]	0.130		–
Ang2	0.04 [0.02–0.12]	0.01 [0.00–0.01]	0.01 [0.00–31.68]	0.274		–
Ang1	0.01 [0.00–0.01]	0.01 [0.00–0.08]	387 [0–575 769]	0.763		–
ICAM1	0.44 [0.10–1.03]	0.23 [0.12–0.54]	0.22 [0.04–1.19]	0.079		–
vWF	0.38 [0.17–0.44]	0.19 [0.14–0.31]	0.04 [0.00–4.43]	0.100		–
RAGE	2.36 [1.25–3.85]	1.30 [0.64–2.00]	0.58 [0.34–0.98]	0.021	0.59 [0.34–1.04]	0.052
VEGF	0.17 [0.07–0.74]	0.33 [0.19–1.72]	0.99 [0.91–1.07]	0.223		–
IL-7	0.48 [0.35–0.62]	0.41 [0.30–0.72]	0.76 [0.03–18.06]	0.645		–
RANTES	0.02 [0.01–0.05]	0.06 [0.01–0.24]	235 [1–66, 569]	0.178		–
SerpinE1	2.42 [0.51–4.56]	1.60 [0.29–5.66]	1.03 [0.85–1.25]	0.564		–

Variables are expressed as median [1st–3rd quartiles] of fluorescence intensity

OR 95% CI odds ratio and their 95% confidence interval

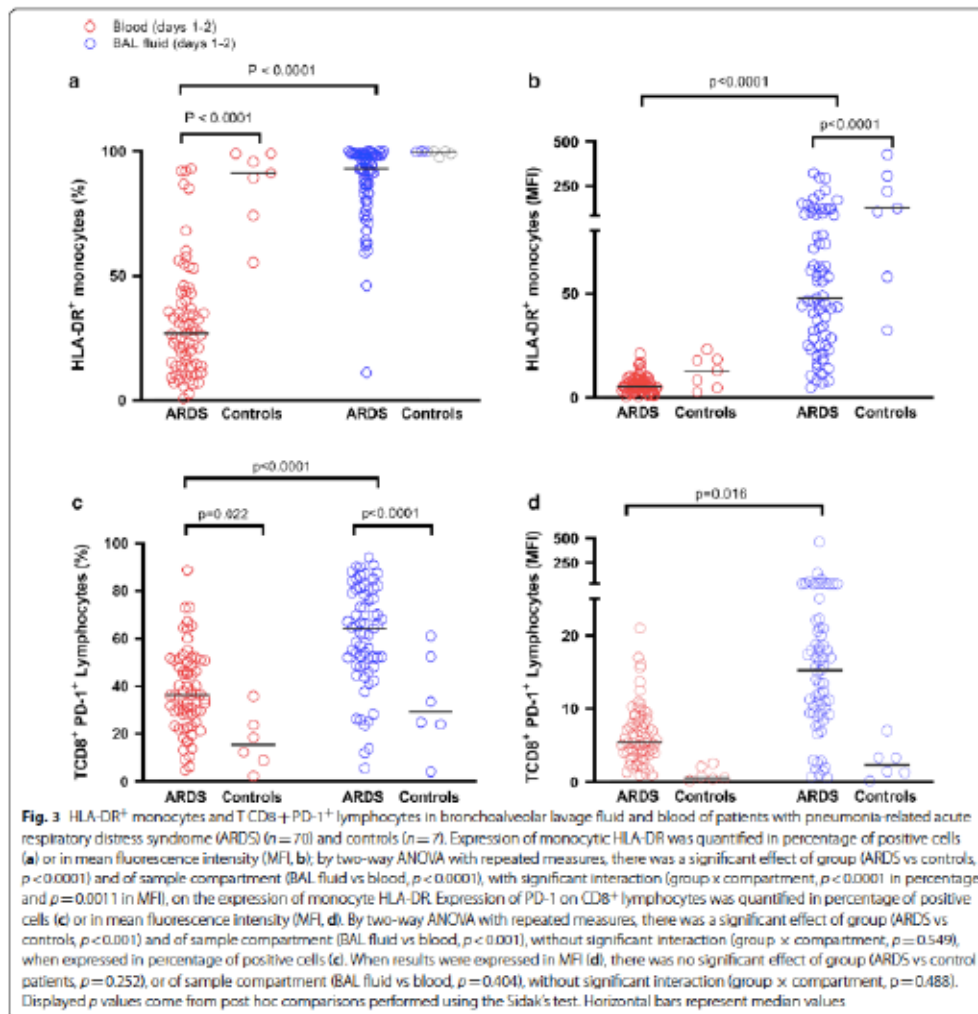
^a Unadjusted p values come from the Mann–Whitney test

^b Adjusted p values yielding statistical significance at the $p < 0.05$ level come from multivariable logistic regression analyses and were adjusted for SOFA and driving pressure by multivariable logistic regression analysis; bolded results are significant at the $p < 0.05$ level

be consistently associated with outcomes [10], possibly because of a compartmentalization of biomarkers during pneumonia-related ARDS. In the current study, we explored the interrelation between alveolar and blood concentrations of biomarkers previously associated with ARDS and observed significant correlations between both compartments for most of the cytokines measured. Yet, alveolar concentrations of pro-inflammatory cytokines, including IL-6, IL-8 and IP-10/CXCL10, and of SP-D, were significantly higher than their serum concentrations, consistent with a lung borne production of these biomarkers, the most compartmentalized of which was IL-8, a potent neutrophil chemoattractant, confirming its pivotal role in ARDS pathophysiology [5, 9]. Moreover, the fact that patients with shock had lower BAL fluid-to-serum concentrations ratios of the main pro/anti-inflammatory cytokines (i.e., IL1-Ra, IL-6, IP-10/CXCL10 and IL-10) suggests that less lung-compartmentalization of these mediators might be a mechanism

leading to extra-pulmonary organ failures complicating the course of ARDS, as previously hypothesized [40, 41]. The fact that lower values of the BAL fluid-to-serum ratio of IL-1Ra was associated with hospital mortality, even after adjusting for SOFA and driving pressure, reinforces this hypothesis.

HLA-DR expression on alveolar monocytes of ARDS patients was lower than that of control patients, suggesting a down-regulation of HLA-DR expression in the infected lungs. Such finding mirrors the previously reported down-regulation of HLA-DR expression on circulating monocytes of patients with septic shock [13]. During septic shock, monocyte deactivation, defined as diminished antigen-presenting capacity reflected by the down-expression of HLA-DR, has been repeatedly associated with morbidity and mortality [14, 15]. The decrease in HLA-DR expression on circulating monocytes is thus a robust predictor of outcome in septic shock patients, which can be restored by



immunostimulation with GM-CSF [24]. However, we did not observe a significant association between early HLA-DR expression on alveolar monocytes and hospital mortality. Few studies focused on the outcome impact of a decreased alveolar monocytic HLA-DR expression. Making the hypothesis that reversing HLA-DR down-regulation on alveolar monocytes would improve outcomes, Herold et al. administered inhaled GM-CSF in six patients with pneumonia-related ARDS with

documented decreased HLA-DR expression on alveolar monocytes, as a compassionate intervention [42]. In this pilot study, inhaled GM-CSF administration was associated with improved oxygenation and restored HLA-DR expression on alveolar monocytes, but the lack of control arm and the low number of patients treated precluded any firm conclusion to be drawn. Our data show that monitoring HLA-DR expression on alveolar monocytes during the first 48 h of pneumonia-related ARDS did not

allow for identifying a subset of patients at higher risk of poor outcomes, thus suggesting this biomarker should not be used—at least during the early phase of ARDS—to monitor regional immune status or guide therapeutic interventions.

Interestingly, HLA-DR expression was higher on alveolar than on circulating monocytes in pneumonia-related ARDS patients. Such compartmentalization of HLA-DR expression has already been observed in septic shock patients [43]. The fact that alveolar monocytic HLA-DR expression was also lower in ARDS than in control patients is consistent with the recruitment of circulating monocytes into the alveolar space [44]. As expected, the SOFA score was negatively correlated with HLA-DR expression on alveolar monocytes, suggesting that the number of organ failures was associated with monocyte deactivation in the lungs, as previously shown in circulating monocytes of septic shock patients [14].

We also quantified PD-1 expression on alveolar and blood T CD8⁺ lymphocytes. Patients with pneumonia-related ARDS exhibited significantly higher PD-1 expression on both alveolar and peripheral circulating T CD8⁺ lymphocytes than control patients. This is consistent with the work of Zhang et al. [45] reporting higher PD-1 expression on peripheral T cells of septic shock patients than on those of controls. Several studies reported that patients with septic shock and high levels of PD-1 expression on peripheral T lymphocytes were more likely to have an increased mortality and more occurrence of nosocomial infections [20] and Morrell et al. reported that PD-L1/PD-1 pathway-associated genes were significantly decreased in alveolar macrophages from ARDS patients who died or had prolonged mechanical ventilation [46]. However, we observed no significant association between PD-1 expression level on alveolar T CD8⁺ lymphocytes and outcomes. Additionally, patients with pneumonia-related ARDS had significantly higher PD-1 expression on alveolar than on blood T CD8⁺ lymphocytes. Such compartmentalization of PD-1 expression was already observed in preclinical experimental as well as in autopsy studies and may chiefly reflect the recruitment of activated lymphocytes at the site of infection [22, 47].

Our study certainly has a number of limitations. This is a monocentric study including a homogeneous population of patients with pneumonia-related ARDS, thus limiting its external validity and the generalizability of the findings. The relatively small number of patients included precluded validating our results in an independent validation cohort, and the results of the conducted analyses, some of which would lose statistical significance after accounting for multiple testing, should be considered exploratory and interpreted

with caution. Regarding the analysis of the relationship between biomarkers and hospital mortality, we have chosen not to control all statistical tests performed for multiple testing but instead preferred to adjust for prognostic variables defined a priori (i.e., SOFA score and driving pressure). Our control patients' population only included spontaneously breathing patients, not receiving antibiotics at the time of BAL fluid sampling, which might have contributed to between group differences. Other limitations of our study are the constraints associated with measuring BAL fluid-to-serum ratios of biomarkers, and limiting their analysis in "real life" conditions. We thus acknowledge the current study is more likely to have an impact on our understanding of the pathophysiology of the compartmentalization of biomarkers during ARDS than on clinical management. The flow cytometry gating strategy used for distinguishing alveolar monocytes from macrophages did not use antibodies for CD206 and CD169 [48] but identified side scatter intermediate (SSC), CD45⁺ and CD14⁺ cells. Although such methods were previously reported [49], we cannot exclude that our alveolar monocytes population was contaminated by macrophages. Last, we chose not to normalize BAL fluid concentrations of the studied biomarkers using BAL fluid-to-serum urea or albumin concentration ratios, as none of these methods has been shown to improve the accuracy of the measurements performed [50, 51]. Our study also has some strengths, including a prospective design allowing for uniform timing of measurements at a clinically relevant time-point and the combination of clinical, flow cytometry and cytokines data.

Conclusion

In conclusion, this study showed that, in patients with pneumonia-associated ARDS, IL-8 was the most compartmentalized cytokine and that lower BAL fluid-to-serum concentration ratios of IL-1Ra were associated with hospital mortality, even after adjusting for SOFA and driving pressure. In contrast, neither alveolar monocytic HLA-DR expression nor T CD8⁺ lymphocyte PD-1 expression were prognostic biomarkers.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03427-y>.

Additional file 1: Tables S1 to S5, Figures S1 to S4.

Abbreviations

ARDS: Acute respiratory distress syndrome; BAL: Bronchoalveolar lavage; HLA-DR: Human leukocyte antigen-DR; PD-1: Programmed death receptor-1; ICU: Intensive care unit.

Acknowledgements

The authors wish to thank the nurses of the medical ICU of Henri Mondor Hospital for their assistance in sampling patients, Aline Alves for her help in processing BAL fluid samples and Jeanne Tran Van Nhie, MD, for performing BAL fluid cytological analyses, and Franck Delafond, Nathalie Crosnier and Lily Wan for their help in performing flow cytometry analyses.

Authors' contributions

IB, ABF and NDP conceptualized and designed the study, supervised and analyzed the data, wrote the manuscript and gave approval of the final version to be submitted; SH, ABF, AP and MS performed laboratory experiments, reviewed the manuscript and gave approval of the final version to be submitted; IB collected the clinical data, reviewed the manuscript and gave approval of the final version to be submitted; FS, SH, KR, GC and AMD reviewed the manuscript and gave approval of the final version to be submitted. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

2013 Clinical Research Grant and 2016 Master 2 grant of the French Intensive Care Society (Société de Réanimation de Langue Française).

Availability of data and materials

All data generated and analyzed during this study are available on demand.

Ethics approval and consent to participate

The current study was approved by the institutional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France V, Paris, France, #13899). Informed consent was obtained from all included patients or their relatives.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

None of the authors have competing interest to disclose.

Author details

¹Service de Médecine Intensive Réanimation, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 51, Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, Cedex, France. ²Groupe de Recherche Clinique CARMAS, Faculté de Santé de Créteil, Université Paris Est Créteil, 94010 Créteil, Cedex, France. ³Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, 94010 Créteil, France. ⁴Département d'Hématologie et d'Immunologie biologiques, AP-HP, Groupe Hospitalo-Universitaire Chenevier Mondor, 94010 Créteil, France. ⁵Unité de Pneumologie, Service de Médecine Intensive Réanimation, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Cedex 94010 Créteil, France. ⁶INSERM U955, Equipe 16, 94 000 Créteil, France. ⁷Vaccine Research Institute, 94 000 Créteil, France. ⁸Faculté de Médecine, Université Paris Est, 94 000 Créteil, France. ⁹INSERM U955, 94 000 Créteil, France.

Received: 22 September 2020 Accepted: 7 December 2020

Published online: 09 January 2021

References

- Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. *JAMA*. 2016;315:788.
- National Heart, Lung, and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2006;354:1671–84.
- Perkins GD, McAuley DF, Thickett DR, Gao F. The β -agonist lung injury trial (BALTI): a randomized placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:281–7.
- McAuley DF, Laffey JG, O'Kane CM, Perkins GD, Mullan B, Tinker TJ, et al. Simvastatin in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2014;371:1695–703.
- Ware LB, Koyama T, Bilheimer DD, Wu W, Bernard GR, Thompson BT, et al. Prognostic and pathogenetic value of combining clinical and biochemical indices in patients with acute lung injury. *Chest*. 2010;137:288–96.
- Calfee CS, Delucchi K, Parsons PE, Thompson BT, Ware LB, Matthay MA. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomized controlled trials. *Lancet Respir Med*. 2014;2:611–20.
- Famous KR, Delucchi K, Ware LB, Kangelaris KN, Liu KD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome subphenotypes respond differentially to randomized fluid management strategy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195:331–8.
- García-Laorden MJ, Lorente JA, Flores C, Slutsky AS, Villar J. Biomarkers for the acute respiratory distress syndrome: how to make the diagnosis more precise. *Ann Transl Med*. 2017;5:283.
- Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet Lond Engl*. 1993;341:643–7.
- van der Zee P, Rietdijk W, Somhorst P, Endeman H, Gommers D. A systematic review of biomarkers multivariately associated with acute respiratory distress syndrome development and mortality. *Crit Care Lond Engl*. 2020;24:243.
- ARDS Definition Task Force. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA*. 2012. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669>.
- Monneret G, Lepape A, Venet F. A dynamic view of mHLA-DR expression in management of severe septic patients. *Crit Care*. 2011;15:198.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:260–8.
- Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohé J, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med*. 2010;36:1859–66.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard A-L, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006;32:1175–83.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:862–74.
- Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219–42.
- Monaghan SF, Thakkar RK, Heffernan DS, Huang X, Chung C-S, Lomas-Neira J, et al. Mechanisms of indirect acute lung injury: a novel role for the co-inhibitory receptor, programmed death-1 (PD-1). *Ann Surg*. 2012;255:158.
- Brahmaram P, Inoue S, Unsinger J, Chang KC, McDunn JE, Hotchkiss RS. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J Leukoc Biol*. 2010;88:233–40.
- Guignat C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care*. 2011;15:R90.
- Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, et al. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:6303–8.
- Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011;306:2594–605.
- Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings DP, Gutensohn K, Jung R, et al. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2003;28:646–51.
- Meisel C, Scheffold JC, Puchowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. GM-CSF to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind randomized placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:640–8.
- Payen D, Falivre V, Miatello J, Leentjens J, Brumpt C, Tissières P, et al. Multicentric experience with interferon gamma therapy in sepsis induced immunosuppression. A case series. *BMC Infect Dis*. 2019;19:931.
- Plantmueller CA, Meisel C, Fux M, Scheffold JC. Assessment of immune organ dysfunction in critical illness: utility of innate immune response

- markers. *Intensive Care Med Exp*. 2017. <https://doi.org/10.1186/s40635-017-0163-0>.
27. Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunomodulatory therapies. *Curr Opin Immunol*. 2013;25:477–83.
 28. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14:121–37.
 29. Gall J-RL, Lemeshow S, Saulnier F. A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) Based on a European/North American Multicenter Study. *JAMA*. 1993;270:2957–63.
 30. Mercat A, Richard J-CM, Vielje B, Jaber S, Osman D, Diehl J-L, et al. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2008;299:646–55.
 31. Papazian L, Forel J-M, Gacouin A, Penot-Ragon C, Perrin G, Loundou A, et al. Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2010;363:1107–16.
 32. Griffiths MJ, Evans TW. Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N Engl J Med*. 2005;353:2683–95.
 33. Guérin C, Reignier J, Richard J-C, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, et al. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2013;368:2159–68.
 34. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Baile R, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med*. 2012;38:1573–82.
 35. Bouadma L, Mourvillier B, Deiler V, Le Corre B, Lolom I, Régnier B, et al. A multifaceted program to prevent ventilator-associated pneumonia: impact on compliance with preventive measures. *Crit Care Med*. 2010;38:789–96.
 36. Mekontso Dessap A, Katsahian S, Roche-Campo F, Varet H, Kouatchet A, Tomicic V, et al. Ventilator-associated pneumonia during weaning from mechanical ventilation: role of fluid management. *Chest*. 2014;146:58–65.
 37. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. An Official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:1004–14.
 38. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, 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*. 1996;21:707–10.
 39. Annato MBR, Mesade MQ, Slutsky AS, Brochard L, Costa ELV, Schoenfeld DA, et al. Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2015;372:747–55.
 40. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, U J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest*. 1997;99:944–52.
 41. Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, Matthay MA, Ancukiewicz M, Bernard GR, et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*. 2005;33:1–6 (discussion 230–2).
 42. Herold S, Hoegner K, Veldsz L, Gessler T, Wilhelm J, Mayer K, et al. Inhaled granulocyte/macrophage colony-stimulating factor as treatment of pneumonia-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:609–11.
 43. Skirecki T, Mikaszewska-Sokolewicz M, Hoser G, Zielińska-Borkowska U. The early expression of HLA-DR and CD64 myeloid markers is specifically compartmentalized in the blood and lungs of patients with septic shock. *Mediators Inflamm*. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3074900>.
 44. Goto Y, Hogg JC, Whalen B, Shih C-H, bhii H, van Eeden SF. Monocyte recruitment into the lungs in pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30:620–6.
 45. Zhang Y, Li J, Lou J, Zhou Y, Bo L, Zhu J, et al. Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care*. 2011;15:R70.
 46. Morell ED, Wiedeman A, Long SA, Gharib SA, West TE, Skerrett SJ, et al. Cytometry TCF identifies alveolar macrophage subtypes in acute respiratory distress syndrome. *JCI Insight*. 2018. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.HL09281>.
 47. Erickson JJ, Glichuk P, Hastings AK, Tollefson SJ, Johnson M, Downing MB, et al. Viral acute lower respiratory infections impair CD8+ T cells through PD-1. *J Clin Invest*. 2012;122:2967–82.
 48. Yu Y-RA, Hotten DF, Malakhov V, Volker E, Ghio AJ, Noble PW, et al. Flow cytometric analysis of myeloid cells in human blood, bronchoalveolar lavage, and lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54:13–24.
 49. Brittan M, Barr L, Morris AC, Duffin R, Rossi F, Johnston S, et al. A novel subpopulation of monocyte-like cells in the human lung after lipopolysaccharide inhalation. *Eur Respir J*. 2012;40:206–14.
 50. Dargaville PA, South M, Vervaart P, McDougall PN. Validity of markers of dilution in small volume lung lavage. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:778–84.
 51. Marcy TW, Merrill WW, Rankin JA, Reynolds HY. Limitations of using urea to quantify epithelial lining fluid recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*. 1987;135:1276–80.

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



3. Article 3: Functional Ex Vivo Testing of Alveolar Monocytes in Patients with Pneumonia-Related ARDS

Inès Bendib, Asma Beldi-Ferchiou, Frédéric Schlemmer, Bernard Maitre, Mathieu Surenaud, Sophie Hüe, Guillaume Carteaux, Keyvan Razazi, Jean-Daniel Lelièvre, Yves Lévy, Armand Mekontso Dessap, Véronique Godot†, Nicolas de Prost†.

Cells 2021 10(12):3546.

† contribution égale

Nous avons observé que l'expression d'HLA-DR par les monocytes alvéolaires était plus faible chez les patients ayant un SDRA septique que chez les patients témoins [380]. Cette observation a fait soulever l'hypothèse d'une désactivation des monocytes dans les poumons des patients SDRA, de façon analogue à ce qui a été observé sur les monocytes circulants de patients en choc septique [285]. Cependant, l'expression d'HLA-DR par le monocyte alvéolaire n'était pas associée au pronostic (mortalité hospitalière) dans notre cohorte de patients atteints de SDRA infectieux. La caractérisation des dysfonctionnements des monocytes induits par le sepsis par des tests fonctionnels (*e.g.*, étude de la phagocytose ou de la capacité de libération de cytokines) pourrait être plus appropriée à l'étude des altérations immunes associées au sepsis dans le compartiment alvéolaire sur le plan de l'enrichissement pronostique. L'immunomonitoring de l'expression d'HLA-DR des monocytes circulants a déjà été utilisée pour identifier les patients susceptibles de bénéficier d'interventions immunomodulatrices [216, 295]. Cependant, peu d'études se sont focalisées sur les monocytes alvéolaires malgré leur rôle central comme première ligne dans la défense innée des infections pulmonaires. Contrairement à l'expression d'HLA-DR sur les monocytes circulants, la quantification d'HLA-DR sur les monocytes alvéolaires n'était pas un biomarqueur pronostique chez les patients atteints de SDRA lié à une pneumonie [380]. Cette divergence nous a amenés à nous interroger sur la relation entre le niveau d'expression alvéolaire d'HLA-DR et les fonctions des monocytes alvéolaires.

Dix patients SDRA et sept patients témoins étaient inclus dans cette étude dont l'objectif principal était d'évaluer la relation entre l'expression monocyttaire d'HLA-DR et leur altération fonctionnelle. Les monocytes étaient immunophénotypés par cytométrie en flux. Les tests

fonctionnels étaient réalisés sur des monocytes sanguins et alvéolaires après stimulation ou non *in vitro* par du LPS. L'activité de phagocytose et la production intracellulaire de TNF étaient quantifiées à l'aide d'anticorps spécifiques conjugués à des fluorochromes [294]. Comme dans le travail précédent [380], les monocytes alvéolaires et sanguins des patients SDRA présentaient une expression d'HLA-DR significativement inférieure à celle des témoins (**Figure 2** de l'article). La capacité de phagocytose des monocytes n'était pas significativement différente selon le groupe (SDRA vs témoins) et selon le compartiment (alvéole vs sang) (**Figure 5** de l'article). Après stimulation par du LPS, les monocytes alvéolaires et sanguins des patients SDRA montraient une production intracellulaire de TNF significativement inférieure à celle des témoins (**Figure 6** de l'article). Enfin, il n'y avait pas de différence significative dans la capacité de phagocytose et la production intracellulaire de TNF des monocytes alvéolaires HLA-DR⁻ vs HLA-DR⁺ (**Figures S2 et S3** du supplément en ligne de l'article, **pages 211 du manuscrit**). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les monocytes des patients SDRA-septique ont un statut désactivé et une capacité de production de cytokines inflammatoires altérée mais conservent une activité phagocytaire similaire aux patients non-SDRA. Le niveau d'expression d'HLA-DR sur les monocytes alvéolaires ne doit cependant pas être utilisé comme marqueur de substitution de l'activité phagocytaire ou de la capacité de production de TNF.

Article

Functional Ex Vivo Testing of Alveolar Monocytes in Patients with Pneumonia-Related ARDS

Inès Bendib ^{1,2,3,4}, Asma Beldi-Ferchiou ^{3,5}, Frédéric Schlemmer ^{3,6}, Bernard Maitre ^{3,6}, Mathieu Surenaud ³, Sophie Hüe ^{3,5}, Guillaume Carreau ^{1,2,3}, Keyvan Razazi ^{1,2,3}, Jean-Daniel Lelièvre ^{3,4,7}, Yves Lévy ^{3,4,7}, Armand Mekontso Dessap ^{1,2,3}, Véronique Godot ^{3,4,†} and Nicolas de Prost ^{1,2,3,*,†}

¹ Service de Médecine Intensive Réanimation, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CEDEX, Créteil, 94010 Paris, France; mes.bendib@aphp.fr (I.B.); guillaume.carreau@aphp.fr (G.C.); keyvan.razazi@aphp.fr (K.R.); armand.dessap@aphp.fr (A.M.D.)

² Groupe de Recherche Clinique CARMAS, Faculté de Santé de Créteil, Université Paris Est Créteil, CEDEX, Créteil, 94010 Paris, France

³ INSERM, IMRB, Université Paris Est Créteil, CEDEX, Créteil, 94010 Paris, France; asma.ferchiou@aphp.fr (A.B.-F.); frederic.schlemmer@aphp.fr (F.S.); bm.maitre@gmail.com (B.M.); mathieu.surenaud@inserm.fr (M.S.); sophie.hue@aphp.fr (S.H.); jean-daniel.lelievre@aphp.fr (J.-D.L.); yves.levy@aphp.fr (Y.L.); veronique.godot@gmail.com (V.G.)

⁴ INSERM U955, Equipe 16, Vaccine Research Institute, Créteil, 94000 Paris, France

⁵ Département d'Hématologie et d'Immunologie Biologiques, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalo-Universitaire Chenevier Mondor, Créteil, 94010 Paris, France

⁶ Unité de Pneumologie, Service de Médecine Intensive Réanimation, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CEDEX, Créteil, 94010 Paris, France

⁷ Service d'Immunologie Clinique et Maladies Infectieuses, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CEDEX, Créteil, 94010 Paris, France

* Correspondence: nicolas.de-prost@aphp.fr; Tel: +33-1-45-17-86-37

† These authors contributed equally.



Citation: Bendib, I.; Beldi-Ferchiou, A.; Schlemmer, F.; Maitre, B.; Surenaud, M.; Hüe, S.; Carreau, G.; Razazi, K.; Lelièvre, J.-D.; Lévy, Y.; et al. Functional Ex Vivo Testing of Alveolar Monocytes in Patients with Pneumonia-Related ARDS. *Cells* **2021**, *10*, 3546. <https://doi.org/10.3390/cells10123546>

Academic Editors: Charles Pilette and Antoine Froidure

Received: 15 November 2021

Accepted: 13 December 2021

Published: 15 December 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: Biomarkers of disease severity might help with individualizing the management of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). During sepsis, a sustained decreased expression of the antigen-presenting molecule human leucocyte antigen-DR (HLA-DR) on circulating monocytes is used as a surrogate marker of immune failure. This study aimed at assessing whether HLA-DR expression on alveolar monocytes in the setting of a severe lung infection is associated with their functional alterations. BAL fluid and blood from immunocompetent patients with pneumonia-related ARDS admitted between 2016 and 2018 were isolated in a prospective monocentric study. Alveolar and blood monocytes were immunophenotyped using flow cytometry. Functional tests were performed on alveolar and blood monocytes after *in vitro* lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Phagocytosis activity and intracellular tumor necrosis factor (TNF) production were quantified using fluorochrome-conjugated-specific antibodies. Ten ARDS and seven non-ARDS control patients were included. Patients with pneumonia-related ARDS exhibited significantly lower HLA-DR expression both on circulating ($p < 0.0001$) and alveolar ($p = 0.0002$) monocytes. There was no statistically significant difference observed between patient groups (ARDS vs. non-ARDS) regarding both alveolar and blood monocytes phagocytosis activity. After LPS stimulation, alveolar ($p = 0.027$) and blood ($p = 0.005$) monocytes from pneumonia-related ARDS patients had a significantly lower intracellular TNF expression than non-ARDS patients. Monocytes from pneumonia-related ARDS patients have a deactivated status and an impaired TNF production capacity but display potent phagocytic activity. HLA-DR level expression should not be used as a surrogate marker of the phagocytic activity or the TNF production capacity of alveolar monocytes.

Keywords: acute respiratory distress syndrome; pneumonia; HLA-DR; TNF; phagocytosis

1. Introduction

Pulmonary infections account for the vast majority of acute respiratory distress syndrome (ARDS) risk factors [1] and are associated with septic shock in about 70% of cases [2]. Although improvements regarding patient phenotyping have been made using multiparametric approaches combining clinical and biological variables [3,4], no single biomarker obtained from blood samples has been shown to reliably predict the outcomes of patients with pneumonia-related ARDS [5], possibly because of an alveolar compartmentalization of biomarkers during severe pulmonary infections [6].

During sepsis, a sustained decreased expression of the antigen presenting molecule human leucocyte antigen-DR (HLA-DR) on circulating monocytes is used as a surrogate marker of immune failure and higher risk of death [7–9]. The overexpression of programmed cell death receptor ligand-1 (PD-L1) also occurs during sepsis and correlates with higher mortality [10]. Monocyte deactivation reflected by down regulation of HLA-DR expression on circulating monocytes [11,12] has been associated with the phenomenon of endotoxin tolerance, defined by a reduction of TNF secretion capacity after *ex vivo* lipopolysaccharide (LPS) stimulation [13]. The appropriate characterization of sepsis-induced monocytes dysfunctions using phagocytosis or cytokine release assays has become a key field of research for the development of innovative therapeutic strategies. Unfortunately, routine assays provide only measurements of immune cell surface biomarkers [14,15].

Down regulation of HLA-DR on circulating monocytes was consistently associated with an increased risk of nosocomial infections [16] and a higher risk of death [8,16–18]. Monitoring circulating monocytes HLA-DR expression has been previously used to identify patients who might benefit from immunomodulatory interventions [19,20]. However, few studies focused on alveolar monocytes despite their central role in the innate frontline defense of pulmonary infections. Contrasting with HLA-DR expression on circulating monocytes, the quantification of HLA-DR on alveolar monocytes was not a prognosis biomarker in patients with pneumonia-related ARDS [6]. This discrepancy led us to question the relationship between alveolar HLA-DR expression level and monocyte functions.

In the current study, which is an ancillary study of the PICARD study [6], we aimed to assess, in a prospective cohort of patients with moderate to severe pneumonia-related ARDS: (1) the phenotype of alveolar and blood monocytes (i.e., levels of HLA-DR and PD-L1 expressions) and compare it to those of non ARDS patients; (2) the function of alveolar and blood monocytes; and (3) explore alveolar monocytes functions according to their level of HLA-DR expression.

2. Materials and Methods (Additional Methods Can Be Found in the Supplementary Materials)

2.1. Study Design

This was a prospective single-center observational cohort study, which is an ancillary study of the PICARD study [6]. Consecutive patients diagnosed with pneumonia-related ARDS admitted to the medical intensive care unit (ICU) of Henri Mondor Hospital, Créteil, France, from January 2016 to December 2018 were eligible for inclusion in the study.

2.2. Patients and Data Collection

All patients with moderate/severe pneumonia-related ARDS [1] were included consecutively with the following inclusion criteria: tracheal intubation and mechanical ventilation for less than 48 h; pulmonary infection diagnosed less than 7 days before ICU admission; bilateral pulmonary infiltrates on chest X-ray; $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio ≤ 200 mm Hg with a positive end-expiratory pressure (PEEP) ≥ 5 cm H_2O . Non-inclusion criteria were as follows: age < 18 years; pregnancy; chronic respiratory failure requiring long-term oxygen therapy; Child-Pugh C liver cirrhosis; lung fibrosis; immunosuppression; SAPS II (Simplified Acute Physiology II score) > 90 ; irreversible neurological disorders; patients

with withholding/withdrawing of life-sustaining therapies and profound hypoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 75$ mm Hg).

Control patients, (i.e., non-mechanically ventilated patients free of ARDS, any active infection, diffuse interstitial pneumonia or immunosuppression; $n = 7$) undergoing a bronchoscopy with broncho-alveolar lavage (BAL) and blood sampling as part of routine care, were also included (Table S1).

Demographics and clinical and laboratory variables were prospectively collected upon ICU admission, at samples collection time points and during ICU stay. Initial severity was assessed using the SAPS II [21] and sequential organ failure assessment (SOFA) scores.

2.3. BAL Fluid and Blood Sampling

BAL fluid was collected from all ARDS patients during a bronchoscopy within 48 h of ARDS onset. BAL fluid samples were also collected from control patients. Concomitant heparin anticoagulated blood samples were obtained in ARDS and control patients. Samples were stored at room temperature and analyzed within 2 h.

BAL fluid cytology was performed by direct microscopy after centrifuging broncho-alveolar lavage fluid samples (12,000 revolutions for 10 min) and dyeing under the May-Grünwald-Giemsa staining. Total (quantified in cells/mL) and differential (i.e., percent of neutrophils, macrophages and lymphocytes) cell counts were measured as recommended [22].

2.4. Pretreatment of Monocytes

Directly after collection, blood and BAL samples were added to an equal volume (100 μL /tube) to IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with or without 200 ng/mL of *Escherichia coli* LPS (*E. coli* K12 LPS, Invivogen, San Diego, CA, USA), then incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO_2 [23]. Samples drawn to measure the intracellular cytokine synthesis of TNF- α were incubated with a Golgi inhibitor (GolgiStop™ 2 μM , Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) for 4 h at 37 °C and 5% CO_2 .

2.5. Phagocytosis Assay

After treatment with *E. coli* LPS (200 ng/mL) or medium alone, a fraction of blood and BAL fluid samples were incubated for 30 min with 20 μL of fluorescent *E. coli* particles (fluorescent pHrodo™ Green *E. coli* BioParticles, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), either at 37 °C and 5% CO_2 to evaluate the phagocytic activity of cells or at +4 °C to assess fluorescent background for bound but not internalized bacteria. Red cells were then lysed using pHrodo™ BioParticles® Phagocytosis kit for flow cytometry (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions. Phagocytosis was quantified on both alveolar and circulating monocytes using FI1/FITC channel and expressed both in percent of positive cells and in delta MFI by retrieving basal MFI of unstained cells.

2.6. Immunophenotyping

Blood and BAL fluid surface immunostaining was performed as follows: 100 μL of whole blood or BAL fluid were incubated with the following conjugated-monoclonal antibodies: CD14-ECD/HLADR-PACBLUE/PDL1-BV785 and, for alveolar samples, CD45-AF700 and CD169-AF647 were added to identify alveolar monocytes [24] (BD Biosciences, San Jose, CA, USA; eBioscience, San Diego, CA, USA; or Beckman Coulter, Brea, CA, USA). After washing steps, cells were fixed with PBS 1% PFA and further acquired with a LSRII cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) within 48 h. Flow cytometer analyses were performed with the FlowJo software (version 10; Tree Star, Ashland, OR, USA). HLA-DR and PD-L1 quantification was expressed in percentage of positive monocytes (% positive cells) among the total monocyte population or in delta MFI. Flow cytometry results were expressed both in percentage of positive cells and delta MFI. A difference

might be observed between percentage of positive cells and MFI as these provide different information: percentage of positive cells reflects the number of monocytes expressing the biomarker of interest, while MFI is the geometric mean of the biomarker fluorescence on each monocyte.

2.7. Assessment of TNF Production by Intracellular Staining

After treatment with *E. coli* LPS (200 ng/mL) or medium alone, blood and BAL fluid samples were immunophenotyped and further used to quantify intracellular TNF synthesis according to the regular PerFix-no centrifuge (nc) (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) procedure. Cells were acquired with a LSRII cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) within 48 h. Flow cytometer analyses were performed with the FlowJo software (version 10; Tree Star, Ashland, OR, USA). TNF quantification was expressed in percentage of positive monocytes (% positive cells) among the total monocyte population (positivity threshold was defined with non-stimulated values from the same donor) or in delta MFI.

2.8. Gating Strategy

Different gating strategies were used in blood and BAL fluid samples. In BAL fluid samples, and as reported by Yu et al. ([24], we first represented cells on an FSC forward-area (FSC-A) versus CD45 (the leukocyte common antigen) dot plot. The non-granulocyte FSC-A^{low} CD45⁺ cells were further examined on a CD14 versus CD45 dot plot. The subsequent CD14⁺ CD45⁺ cells were then examined in an FSC-A versus CD169 dot plot to distinguish alveolar monocytes (FSC^{low} CD14⁺ CD169⁻) from alveolar macrophages (FSC^{low} CD14⁺ CD169⁺) (Figure S1a). HLA-DR positive (HLA-DR⁺) monocytes were defined as monocytes with an HLA-DR expression greater than the 99% confidence interval of negative control values (Figure S1). The monocytes CD45⁺, CD14⁺, CD 169⁻ and HLA-DR negative were identified as the monocytes HLA-DR⁻ population in contrast of monocytes CD45⁺, CD14⁺, CD169⁻ and HLA-DR⁺ issued from the same alveolar sample. Circulating monocytes were defined as FSC-A^{low} CD14⁺ cells (Figure S1b) in blood samples. Expression of HLA-DR, PD-L1 and TNF on alveolar and blood monocytes was then analyzed.

2.9. Inflammation and Endothelium/Alveolar Epithelium Injury Biomarkers Quantification in BAL Fluid Supernatants

Concentrations of 22 biomarkers were measured using Luminex[®] multiplex bead-based technology (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in BAL fluid supernatant and serum from 70 pneumonia-related ARDS from the PICARD cohort [6]. These included inflammatory markers and cytokines/chemokines (interleukin (IL)-1Ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12/23p40, IL-13, IL-17A, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), RANTES, IP-10/CXCL10, and Serpin E1), endothelial injury (intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), von Willebrand Factor (vWF), and Angiopoietin (Ang)-1/2) and alveolar epithelium injury (receptor for advanced glycation end products (RAGE), surfactant protein (SP)-D, and amphiregulin). The results of quantification were expressed as fluorescence intensities.

2.10. Data Presentation and Statistical Analysis

Continuous variables are reported as median (1st–3rd quartiles) and compared using the Mann-Whitney test. When more than two groups were compared, comparisons were performed using two-way ANOVA with repeated measures, and post-hoc comparisons were performed using the Sidak's test. Variables are expressed as numbers and percentages and compared with the Chi² or Fischer tests. Spearman correlation coefficients were computed for continuous-continuous variables correlations (Benjamini-Hochberg correction was performed to account for test multiplicity). A *p* value < 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 8.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and R 3.1.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3. Results

3.1. Patients

One hundred eighty-eight patients with moderate-to-severe pneumonia-related ARDS were admitted to the ICU during the four-year study period, of whom one hundred eighteen had non-inclusion criteria and seventy were included in the PICARD study [6]. Functional tests were performed on alveolar and blood samples from a subgroup of ten patients with pneumonia-related ARDS and a control group of seven non-ARDS control patients (Figure 1). These patients were included in this sub-study consecutively over a six-month period. Among patients with pneumonia-related ARDS ($n = 10$), a microbiological documentation was obtained in eight patients, seven of whom had bacterial infections and one of whom had a viral infection (none of the patients had a bacterial and viral coinfection) (Table S2).

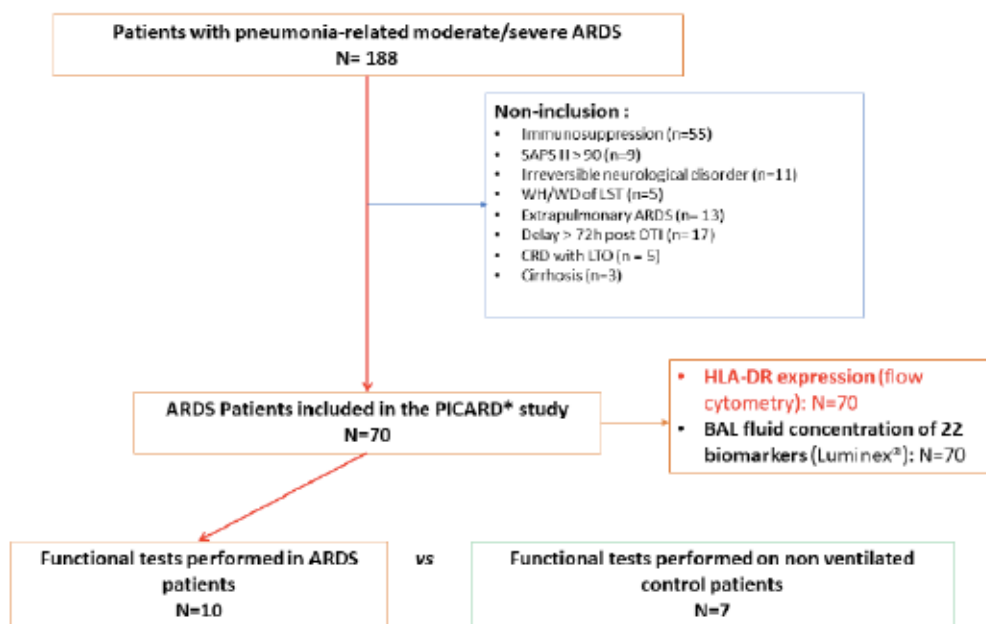


Figure 1. Flow chart of patients with pneumonia-related moderate/severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) included in the study. BAL: broncho-alveolar lavage; CRD: chronic respiratory disease; LTO: long term oxygenotherapy; OTI: oro-tracheal intubation; WH/WD of LST: withholding/withdrawal of life-sustaining therapies; * Patients included in the PICARD study are comprehensively described elsewhere [6].

The comorbidities and clinical and biological characteristics of patients at the time the BAL was sampled (i.e., after a median delay of one day following intubation) are presented in Table 1.

Septic shock was present in 60% of patients ($n = 6/10$) at the time of BAL fluid sampling, and in-hospital mortality was 30% ($n = 3/10$, Table 2). As expected in pneumonia-related ARDS, BAL fluid cellularity was elevated, as compared to non-ARDS controls (median (IQR 25–75): 567 (365–720) vs. $130 \times 10^3/\text{mL}$ (77–137) G/L; $p = 0.0001$) and differential cell counts showed a majority of neutrophils (80.5 (8.8–85.5) vs. 1.0% (0.7–1.0); $p = 0.0001$) and fewer macrophages (median 15.5 (8.8–85.5) vs. 66.0% (66.0–85.5); $p = 0.001$), consistent with alveolar inflammation (Table 1).

Table 1. Demographics and clinical and biological features of patients with pneumonia-associated acute respiratory distress syndrome ($n = 10$) and non-ARDS controls ($n = 7$) upon BAL fluid sampling. Continuous variables are presented as median [1st–3rd quartiles]; p values come from the Mann-Whitney test; categorical variables are shown as n (%); p values come from the chi2 or the Fisher exact test, as appropriate. ARDS: acute respiratory distress syndrome; COPD: chronic obstructive disease; WBC: white blood cell. Bolded results are significant at the $p < 0.05$ level.

	All ($n = 17$)	ARDS ($n = 10$)	Control Patients ($n = 7$)	P
Age (years)	61 (40–69)	63.5 (58–76)	40 (27–53)	0.11
Male gender	7 (41)	3 (30)	4 (57)	0.95
Comorbidities				
Diabetes mellitus	2 (12)	1 (10)	1 (14)	0.98
COPD	2 (12)	1 (10)	1 (14)	0.98
Chronic heart failure	2 (12)	2 (20)	0 (0)	0.36
Chronic renal disease	2 (12)	2 (20)	0 (0)	0.36
Sickle cells disease	1 (6)	1 (10)	0 (0)	0.63
Tobacco	7 (41)	3 (30)	4 (57)	0.58
Blood leukocytes				
WBC counts (G/L)	10.0 (6.0–10.0)	8.5 (5.9–9.7)	6.4 (6.0–9.3)	0.72
Neutrophils (G/L)	7.9 (3.7–12.5)	9.4 (7.9–14.9)	3.7 (3.5–6.3)	0.03
Monocytes (G/L)	0.6 (0.4–0.8)	0.8 (0.4–0.9)	0.6 (0.4–0.7)	0.45
Lymphocytes (G/L)	1.3 (0.9–2.0)	0.9 (0.7–0.9)	1.5 (1.3–2.3)	0.02
BAL fluid cytology				
Leukocytes (10^3 /mL)	250.0 (130.0–570.0)	567.5 (365.0–720.0)	130.0 (77.0–136.6)	0.0001
Macrophages (%)	33.0 (15.0–66.0)	15.5 (8.8–85.5)	66.0 (66.0–85.5)	0.0001
Neutrophils (%)	60.0 (1.0–81.0)	80.5 (61.2–89.5)	1.0 (0.7–1.0)	0.0001
Lymphocytes (%)	6.5 (2–29)	3.2 (2.0–6.1)	30.0 (12.5–33.0)	0.012

Table 2. Severity and outcomes of patients with pneumonia-associated acute respiratory distress syndrome ($n = 10$). * as defined by the Sepsis 3 definition. Continuous variables are presented as median [1st–3rd quartiles]; categorical variables are shown as n (%). ARDS: acute respiratory distress syndrome; Crs: compliance of the respiratory system; ICU: intensive care unit; SOFA: sequential organ failure assessment; SAPS II: simplified acute physiology score II; VFD: ventilator free days.

ARDS ($n = 10$)	N (%) or Median (IQR 25–75)
SAPS II	60 (43–68)
SOFA score	12 (8–14)
ARDS severity	
Moderate	5 (50)
Severe	5 (50)
PaO ₂ /FiO ₂ (mm Hg)	96 (72–128)
C _{RS} (mL/cmH ₂ O)	26 (22–33)
Septic shock *	6 (60)
Duration of ICU stay (days)	18 (9–33)
Live VFD at day-28 (days)	14 (5–23)
Ventilator-acquired pneumonia	4 (40)
In-hospital mortality	3 (30)

3.2. HLA-DR Expression on Alveolar and Blood Monocytes

We quantified the monocytic expression of HLA-DR, a prognostic cell surface biomarker in septic shock patients [17], on alveolar and circulating monocytes. As previously shown [6], within 48 h of tracheal intubation, and as compared with non-ARDS controls, patients with pneumonia-related ARDS exhibited significantly lower HLA-DR expression both on circulating ($p < 0.0001$; Figure 2a,b) and alveolar ($p = 0.0002$ when expressed in MFI; Figure 2b) monocytes. The effect of severe lung infection is thus to decrease not only blood but also alveolar monocytic HLA-DR expression level.

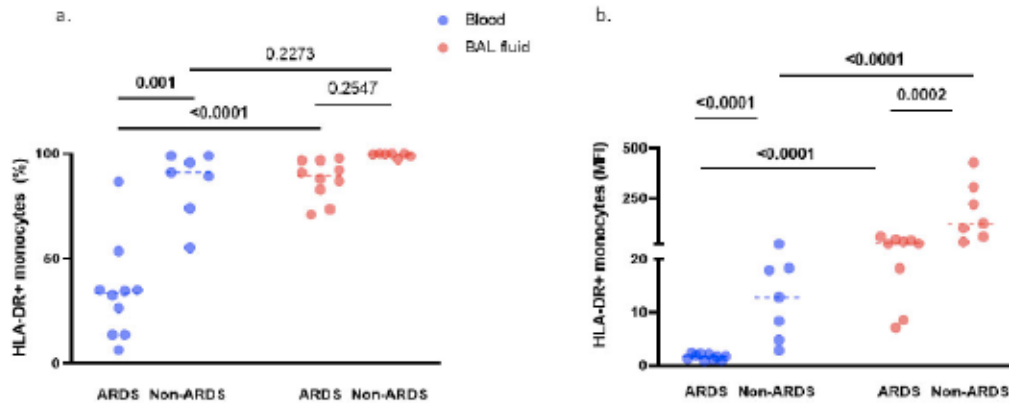


Figure 2. HLA-DR expression on monocytes in broncho-alveolar lavage (BAL) fluid and blood of pneumonia-related ARDS ($n = 10$) and non-ARDS patients ($n = 7$). Expression of monocytic HLA-DR was quantified in percentage of positive cells (a) or in mean fluorescence intensity (MFI) (b) in standard conditions (medium). By two-way ANOVA with repeated measures, there was a significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS, $p < 0.0001$) and of sample compartment (BAL fluid vs. blood, $p < 0.0001$), with significant interaction (group \times compartment, $p < 0.001$) on monocytic HLA-DR expression, expressed in percentage of positive cells (a). When results were expressed in MFI (b), there was a significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS patients, $p = 0.001$) and of sample compartment (BAL fluid vs. blood, $p = 0.0002$), with significant interaction (group \times compartment, $p = 0.005$). Displayed p -values come from post-hoc comparisons performed using the Sidak's test. Bolded p values are significant at the <0.05 level. Horizontal bars represent median values.

Patients with pneumonia-related ARDS also displayed dramatically higher HLA-DR expression ($p < 0.0001$; Figure 2a,b) on alveolar than on blood monocytes. In non-ARDS patients, we also observed a higher HLA-DR expression on alveolar than on blood monocytes (when expressed in MFI, $p < 0.0001$, Figure 2b), indicating that the alveolar compartmentalization of monocytic HLA-DR expression is not specific to severe lung infections.

In order to further explore the relationship between the HLA-DR expression of alveolar monocytes and the alveolar milieu, we quantified the alveolar concentration of 22 biomarkers and correlated it with monocytic HLA-DR level in a larger cohort of 70 ARDS patients from the PICARD study. We also included in the correlation matrix the clinical parameters of patients. HLA-DR on alveolar monocytes correlated negatively with two clusters: one cluster comprised BAL fluid cellularity and SOFA score, as a reflection of global lung inflammation and organ failures, while the second cluster included cytokines involved in the activation of innate immunity (RANTES, IL-6, IL-1Ra, TNF- α) as well as markers of alveolar epithelial (Amphiregulin, serpin) and endothelial (Ang2) injury (Figure 3).

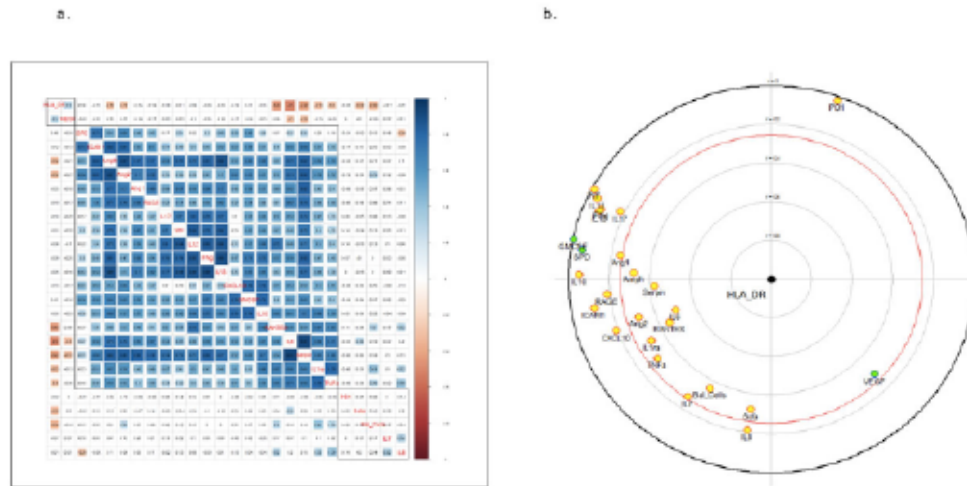


Figure 3. (a) Correlation matrix of broncho-alveolar lavage fluid monocytic HLA-DR expression (in MFI), concentrations of cytokines/alveolar epithelial/endothelial injury biomarkers, SOFA score and total BAL cellularity (per mL) in pneumonia-related ARDS patients ($n = 70$). Spearman correlation coefficients are provided for continuous-continuous variables correlations, with positive (blue) and negative (red) correlation coefficients indicating statistical significance at the $p < 0.05$ level after Benjamini-Hochberg correction for test multiplicity. (b) Focused principal component analysis (FPCA) displaying the relationships between HLA-DR expression on alveolar monocytes and cytokines/alveolar epithelial/endothelial injury biomarkers concentrations in BAL fluid of pneumonia-related ARDS patients. FPCA is a simple graphical display of correlation structures focusing on a particular dependent variable. The display reflects primarily the correlations between the dependent variable and all other variables (covariates) and secondarily the correlations among the covariates. The dependent variable (HLA-DR expression on alveolar monocytes, expressed in mean fluorescence intensity) is at the center of the diagram, and the distance of this point to a covariate faithfully represents their pairwise Spearman correlation coefficient (using ranked values of continuous variables). Green covariates are positively correlated, and yellow ones are negatively correlated. The red circle delimits statistical significance (at the 5% level). The diagram also shows relationships among covariates. Their relative position is informative as follows: two covariates close to one another indicate a strong positive correlation between them; two diametrically opposed covariates indicate a strong negative correlation between them; two covariates making a right angle with the origin indicate absence of correlation between them.

3.3. PD-L1 Expression on Alveolar and Blood Monocytes

As another marker of monocyte dysfunction [25,26], we measured the expression of checkpoint inhibitor and marker of immune suppression, PD-L1, on alveolar and circulating monocytes. PD-L1 expression on monocytes obtained from pneumonia-related ARDS patients was not significantly different from that measured on monocytes of their non-ARDS counterparts (Figure 4a,b). Notably, there was a higher PD-L1 expression on alveolar than on blood monocytes for both pneumonia-related ARDS and non-ARDS control patients (when expressed in MFI, Figure 4b), reflecting an alveolar compartmentalization of monocytic PD-L1 expression.

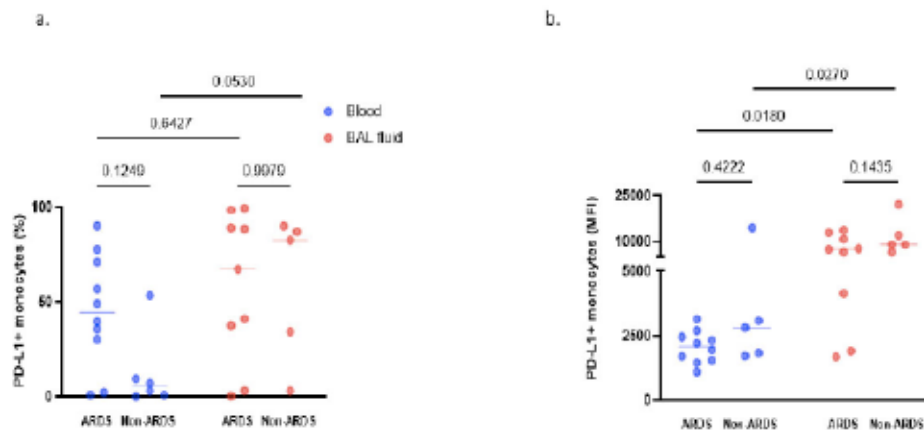


Figure 4. PD-L1 expression on monocytes in broncho-alveolar lavage fluid and blood of pneumonia-related ARDS ($n = 9$) and non-ARDS patients ($n = 5$, anti-PD-L1 antibodies were missing for three experiments). Expression of PD-L1 on monocytes was quantified in percentage of positive cells (a) or in mean fluorescence intensity (MFI) (b) in standard conditions (medium). By two-way ANOVA with repeated measures, there was a significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS, $p = 0.0490$) but no significant effect of compartment (BAL fluid vs. blood, $p = 0.2484$), nor effect of interaction (group \times compartment, $p = 0.2461$), when expressed in percentage of positive cells (a). When results were expressed in MFI (b), there was a significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS patients, $p = 0.0010$), also a significant effect of sample compartment (BAL fluid vs. blood, $p = 0.0192$), without significant interaction (group \times compartment, $p = 0.6032$). Displayed p -values come from post-hoc comparisons performed using the Sidak's test. Horizontal bars represent median values.

3.4. Functional Testing of Alveolar and Blood Monocytes

- Phagocytosis activity of alveolar and circulating monocytes after LPS pretreatment.

The phagocytosis activity of alveolar and blood monocytes was measured before (Figure 5a) and after (Figure 5b) LPS challenge in ten patients with pneumonia-related ARDS and seven non-ARDS controls. There was no statistically significant difference observed between patient groups (ARDS vs. non-ARDS) regarding both alveolar and blood monocytes phagocytosis activity. Yet, as compared to circulating monocytes, alveolar monocytes from ARDS patients exhibited a decreased phagocytosis activity both before (Figure 5c, MFI, $p = 0.0002$) and after (MFI, $p = 0.0013$) LPS challenge (Figure 5d).

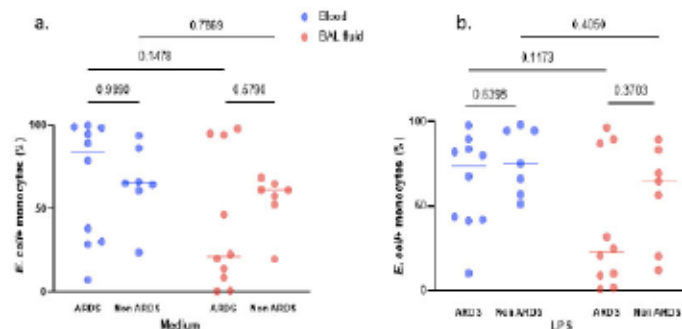


Figure 5. Cont.

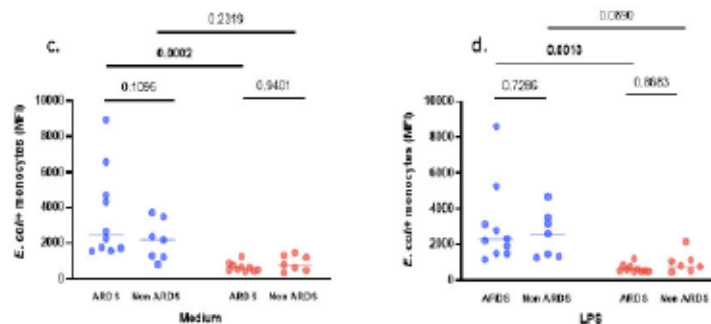


Figure 5. Phagocytosis of *E. coli* particles by alveolar and blood monocytes measured by flow cytometry. The phagocytosis activity of alveolar and blood monocytes has been measured with and without (medium condition) LPS challenge and expressed in percentage of positive cells (%) (a,b) and in mean fluorescence intensity (MFI) (c,d) in ten pneumonia-related ARDS and seven non-ARDS patients. Phagocytosis activity was analyzed by two-way ANOVA with repeated measures. When results were expressed in %, there was no significant effect of compartment (BAL fluid vs. blood, $p = 0.1087$) and neither significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS, $p = 0.5264$) nor significant interaction (group \times compartment, $p = 0.4903$) in medium condition (a). After LPS challenge (b), there was a significant effect of compartment (BAL fluid vs. blood, $p = 0.0361$) but there was no significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS patients, $p = 0.1397$), nor significant interaction (group \times compartment, $p = 0.7593$). When results were expressed in MFI, there was a significant effect of compartment (BAL fluid vs. blood, $p = 0.0003$) but neither significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS, $p = 0.2469$) nor significant interaction (group \times compartment, $p = 0.1145$) in medium condition (c). After LPS challenge (d), there still was a significant effect of compartment (BAL fluid vs. blood, $p = 0.0010$) but there was neither significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS patients, $p = 0.8645$) nor significant interaction (group \times compartment, $p = 0.4072$). Displayed p -values come from post-hoc comparisons performed using the Sidak's test. Bolded p values are significant at the <0.05 level. Horizontal bars represent median values.

- Intracellular TNF quantification in alveolar and circulating monocytes after LPS stimulation.

One of the hallmark features of monocyte deactivation is the impaired capacity of TNF production in response to LPS stimulation. We thus assessed the intracellular TNF production of both circulating and alveolar monocytes obtained from pneumonia-related ARDS patients and non-ARDS patients. As expected, LPS challenge *ex vivo* significantly increased the intracellular TNF synthesis (Figure 6). Such effect was statistically significant in circulating (Figure 6a) and alveolar (Figure 6b) monocytes of non-ARDS patients but not in those of ARDS patients.

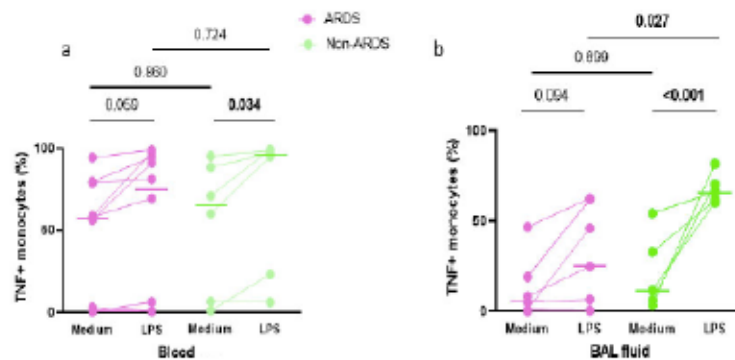


Figure 6. Cont.

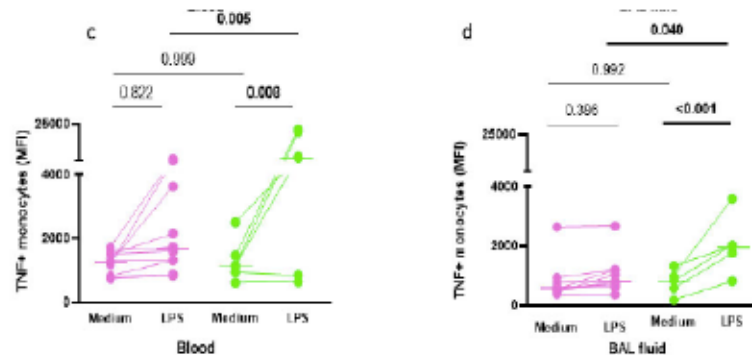


Figure 6. Alveolar and blood monocytes intracellular TNF expression. Intracellular expression of TNF by alveolar and blood monocytes was measured before (medium) and after (LPS) LPS challenge, and expressed in percentage of positive cells (a,b) and in mean fluorescence intensity (MFI) (c,d) in ten pneumonia-related ARDS (pink symbols) and seven non-ARDS (green symbols) patients. In blood monocytes (a,c), by two-way ANOVA with repeated measures, there was a significant effect of the experimental condition (medium vs. LPS, in percentage of positive cells, $p = 0.003$ (a) or MFI, $p = 0.025$ (c)) and a significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS, when expressed in MFI, $p = 0.005$ (c) but not in percentage of positive cells, $p = 0.547$ (a)), as well as a significant interaction (experimental condition \times group, when expressed in MFI, $p = 0.027$ (c), but not in % of positive cells, $p = 0.516$ (a)). In BAL fluid monocytes (b,d), there was a significant effect of the experimental condition (medium vs. LPS, in percentage (b) ($p < 0.001$) and MFI (d) ($p = 0.015$)), no significant effect of group (ARDS vs. non-ARDS), either in percentage (b) ($p = 0.114$) or MFI (d) ($p = 0.106$), and a significant interaction (experimental condition \times group) when expressed in percentage of positive cells (b) ($p = 0.023$) but not when expressed in MFI (d) ($p = 0.078$). Displayed p -values come from post-hoc comparisons performed using the Sidak's test. Horizontal bars represent median values.

When considering intracellular TNF expression after LPS stimulation, alveolar monocytes from pneumonia-related ARDS patients had a significantly lower intracellular TNF expression than non-ARDS patients (Figure 6b,d). Likewise, blood monocytes from ARDS patients showed significantly lower intracellular TNF concentration after LPS challenge than did those from non-ARDS patients (Figure 6c, $p = 0.005$). In addition, alveolar monocytes from pneumonia-related ARDS had a significantly lower LPS-induced TNF expression than circulating monocytes issued from the same patients when expressed in percent of positive cells ($p = 0.011$).

Our finding of a reduced responsiveness to an LPS challenge, illustrated by an impaired capacity of alveolar and blood monocytes from ARDS patients to increase their TNF synthesis capacity, is consistent with an endotoxin tolerant profile.

- Phagocytosis activity and TNF production of alveolar monocytes according to their HLA-DR expression.

Finally, we assessed whether the function of monocytes and their level of HLA-DR expression was linked. We thus quantified alveolar monocytes phagocytosis capacity (Figure S2) and LPS-induced intracellular TNF concentrations (Figure S3, results expressed in percentage of positive cells and MFI) according to their HLA-DR⁻ vs. HLA-DR⁺ phenotype and did not observe any statistical difference between these two phenotypes.

4. Discussion

The current study assessed the phenotype and function of alveolar and circulating monocytes obtained from patients with pneumonia-related ARDS. The main results of the current study are as follows: (1) Alveolar monocytes from ARDS patients showed a decreased HLA-DR expression, as compared with blood monocytes, and a significant correlation with cytokines involved in the activation of innate immunity, as well as with markers of alveolar epithelial/endothelial injury; alveolar monocytes of ARDS patients, together with those of controls, showed higher PD-L1 expression than those of blood

monocytes; (2) The phagocytosis activity and intracellular production of TNF after *ex vivo* LPS stimulation of alveolar monocytes were decreased in ARDS patients; and (3) Alveolar monocytes phagocytosis capacity and LPS-induced intracellular TNF concentrations did not differ according to their HLA-DR⁻ vs. HLA-DR⁺ phenotype. These findings are consistent with the existence of functional immune alterations in the alveolar compartment of critically ill patients having severe pulmonary infections and ARDS.

Monocytes have a pivotal role in antigen-presentation, together with pathogen clearance and induction and regulation of inflammation. The sequential measurement of HLA-DR expression on circulating monocytes has gained considerable interest over the past several decades in identifying altered immune status among severe ICU patients [27]. However, alveolar monocytes have been poorly investigated, although these represent the first immune lines during pulmonary infections. In the current study, we observed an alveolar compartmentalization of HLA-DR expression in ARDS patients, confirming our previous results [6] and illustrating our cohort is well representative of patients with pneumonia-associated ARDS regarding monocytic HLA-DR expression. Such an expression pattern might not be a consequence of the local activation of monocytes at the site of the primary infection but rather a global effect of inflammation as already reported by Skirecki et al. [28]. Yet, HLA-DR expression on alveolar monocytes obtained from patients with pneumonia-related ARDS was lower than that from non-ARDS patients, consistent with the recruitment of deactivated monocytes in the infected lungs. However, we previously showed that the level of alveolar monocytic HLA-DR expression was not a prognosis biomarker in ARDS patients with severe pneumonia, suggesting that, in the context of severe pulmonary infection, the function of alveolar monocytes might be more informative than their phenotype regarding outcome prediction.

Monocyte PD-L1 overexpression was associated with defects in immune function [29] and independently associated with 28-day mortality in septic shock patients [30]. Genome-wide expression measurements revealed that the expression of PD-L1 and PD-L1/PD-1 pathway-associated genes were significantly upregulated in patients with ARDS who survived or were extubated within 28 days compared to non-survivors or intubated patients [31]. In contrast, blockade of the PD-1 pathway induced ARDS-like pneumonitis in patients during anti-PD-1/PD-L1 therapy [32]. More recently, Monaghan et al. reported soluble PD-1 as a potential biomarker in human and experimental extra-pulmonary ARDS [33]. These results suggest that the PD-1/PD-L1 axis is involved in the development of ARDS [3]. In our study, we observed a higher PD-L1 expression on alveolar than on blood monocytes in ARDS and non-ARDS patients, with possible downstream inhibitory effects on T-cell activation. Previous works showed that such a pattern could predispose the host to a dangerous situation upon lung infection [34]. This surface biomarker might be used as a therapeutic target in this setting. Indeed, anti-PD-L1 antibodies have shown benefits in animal models of sepsis and are currently being tested in clinical trials in sepsis [35,36]. Yet, our data show no significant difference in alveolar monocyte expression levels between ARDS patients and controls, suggesting further studies are required to better delineate the involvement of the PD-1/PD-L1 axis in the alveolar compartment at the acute phase of ARDS.

The primary aim of this study was to evaluate alveolar monocyte functions in patients with severe pneumonia and ARDS by exploring their phagocytosis capacity and intracellular TNF production after LPS exposure, together with their relationship with HLA-DR expression. The phagocytic capacity of monocytes was not different in ARDS patients than in controls, contrasting with the downregulation of HLA-DR expression on both alveolar and circulating monocytes, reflecting a defect in their antigen-presenting capacity. This finding was already reported in circulating monocytes from septic patients [37]. Such monocyte pattern resembles that described in alveolar monocytes from cystic fibrosis patients under the effects of pro-resolving mediators, which present enhanced phagocytic activity without evoking proinflammatory responses [15,38]. In ARDS patients, no difference was observed between alveolar and circulating monocytes when the phagocytosis

capacity was quantified in percentage of positive cells. In contrast, using MFI, we observed a lower *E. coli*-associated fluorescent signal in alveolar monocytes, which persisted after ex vivo LPS stimulation. It has been previously shown that functional, endotoxin-tolerant monocytes exhibit an increased phagocytic ability coupled with a conserved capacity to kill internalized pathogens, albeit with an impaired antigen-presentation capacity [15,38,39]. Our data suggest that in pneumonia-related ARDS patients, the phagocytosis of alveolar monocytes seems to be less efficient than that of circulating monocytes but as efficient as that of non-ARDS controls.

In the present work, we took advantage of recent intracellular staining flow cytometry methods to detect intracellular TNF production [13] in alveolar and circulating monocytes. As expected, alveolar and circulating monocytes from pneumonia-related ARDS patients were hypo-responsive to ex vivo LPS stimulation. Regarding monocytes, many studies have previously reported the altered capacity of circulating monocytes of septic patients to release proinflammatory cytokines in response to LPS stimulation, TLR agonists, or whole bacteria in vitro [15,40,41]. Fumeaux et al. observed that septic circulating monocytes were characterized by an altered IL-10/TNF intracellular ratio [42]. Accordingly, transcriptomic assays in LPS-challenged peripheral blood mononuclear cells from patients facing gram-negative infections retrieved endotoxin tolerance while enhanced anti-microbial activity and tissue repair [43]. Alveolar monocytes from pneumonia-related ARDS patients exhibited a characteristic behavior of cytokine hypo-responsiveness while exhibiting preserved uptake functions, consistent with a “reprogrammed” rather than an “exhausted” phenotype. This modulation represents a state in which the host attempts to control the initial systemic inflammatory response while maintaining control over the infection. This modulation may represent the return to homeostasis in cases of successful antimicrobial therapy and recovery of underlying disease. In contrast, failure to mount a robust inflammatory response may represent a state of immunosuppression in protracted patients.

Furthermore, we observed a negative correlation between HLA-DR expression on alveolar monocytes and the alveolar concentrations of cytokines involved in innate immunity (i.e., IL-6, RANTES, IL-1Ra, and TNF), suggesting that a proinflammatory microenvironment is associated with alveolar monocyte deactivation. As expected, the SOFA score was negatively correlated with HLA-DR expression on alveolar monocytes, illustrating that the number of organ failures was associated with monocyte deactivation in the lungs, as previously shown in circulating monocytes of septic shock patients [16].

Our study certainly has a number of limitations. This is a monocentric study including a homogeneous population of patients with pneumonia-related ARDS, thus limiting its external validity and the generalizability of the findings. The relatively small number of patients included precluded validating our results in an independent validation cohort, and our findings should thus be reconfirmed in a larger population. We included a limited population of non-ARDS controls free of infection and who were younger than patients from the ARDS group (63 vs. 40 years). On one hand, we cannot exclude that these patients might have mild systemic and/or lung inflammation, as these were patients undergoing a bronchoscopy as part of routine care. On the other hand, HLA-DR expression was previously shown to be reduced in elderly patients, possibly contributing to immunosenescence [44]. Therefore, age could have influenced the observed difference in HLA-DR expression between ARDS and non-ARDS patients. In addition, including COVID-19 patients would have been of great interest but was not feasible because of technical and logistical constraints. Therefore, while the results of this study do not point to a definitive association between monocyte phenotype (HLA-DR and PD-L1 expression) and its function, as a hypothesis-generating study, they do provide sufficient evidence to warrant additional research in this area. As there is no clinical sign of immune dysfunction, it is crucial to identify the best biological tools for patients’ stratification according to their immune status. Since it directly measures the ex vivo capacity of a cell population to respond to an immune challenge, functional testing ideally represents the best method to establish the occurrence of immunosuppression. The current results indicate that the

examination of the functional capacities of alveolar monocytes might provide new insights into the pathophysiology of severe lung infections and associated ARDS.

5. Conclusions

In conclusion, in patients with pneumonia-related ARDS, this study showed that monocytes have a deactivated status and an impaired inflammatory cytokine production capacity but keep similar phagocytic activity to non-ARDS controls. HLA-DR expression level on alveolar monocytes should not be used as a surrogate marker of phagocytic activity or TNF production capacity. Dedicated tests exploring these key roles of monocytes' functions during severe lung infections might be interesting to better explore the pathophysiology of the disease and identify new prognostic biomarkers.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10123546/s1>, Figure S1: Gating strategy of flow cytometric analyses of monocytes in broncho-alveolar lavage fluid (a,b) and blood (c,d), Figure S2: Phagocytosis of E. coli particles by alveolar monocytes according to their HLA-DR expression measured by flow cytometry, Figure S3: Alveolar monocytes intracellular TNF expression according to HLA-DR expression measured by flow cytometry, Table S1: Characteristics of non-ARDS patients (n = 7) included in the study, Table S2: Microbiological documentation of patients (n = 10) with pneumonia-related ARDS.

Author Contributions: Conceptualization, I.B., V.G. and N.d.P.; methodology, I.B., V.G. and N.d.P.; software, M.S., A.M.D. and N.d.P.; validation, V.G. and N.d.P.; formal analysis, I.B., V.G. and N.d.P.; investigation, I.B., V.G. and N.d.P.; resources, I.B., A.B.-F., F.S., B.M., S.H. and M.S.; data curation, I.B. and M.S.; writing—original draft preparation, I.B., V.G. and N.d.P.; writing—review and editing, I.B., A.B.-F., F.S., B.M., M.S., S.H., G.C., K.R., J.-D.L., Y.L., A.M.D., V.G., and N.d.P.; visualization: all co-authors; supervision, V.G. and N.d.P.; project administration, N.d.P.; funding acquisition, N.d.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French Intensive Care Society, 2013 Clinical Research Grant and 2016 Master 2 grants.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the institutional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France V, Paris, France, #13899).

Informed Consent Statement: Written informed consent has been obtained from the patients or their relatives to publish this paper.

Data Availability Statement: Contact the corresponding author for direct access to the dataset pertaining to data presented in this article.

Acknowledgments: The authors wish to thank the patients and their families, the nurses of the medical ICU of Henri Mondor Hospital for their assistance in sampling patients, Aline Alves for her help in processing BAL fluid samples, and Jeanne Tran Van Nhieu, for performing BAL fluid cytological analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA* **2012**, *307*, 2526–2533. [\[CrossRef\]](#)
2. Brun-Buisson, C.; Minelli, C.; Bertolini, G.; Brazzi, L.; Pimentel, J.; Lewandowski, K.; Bion, J.; Romand, J.-A.; Villar, J.; Thorsteinsson, A.; et al. Epidemiology and Outcome of Acute Lung Injury in European Intensive Care Units. Results from the ALIVE Study. *Intensive Care Med.* **2004**, *30*, 51–61. [\[CrossRef\]](#)
3. Calfee, C.S.; Delucchi, K.; Parsons, P.E.; Thompson, B.T.; Ware, L.B.; Matthay, M.A. Subphenotypes in Acute Respiratory Distress Syndrome: Latent Class Analysis of Data from Two Randomised Controlled Trials. *Lancet Respir. Med.* **2014**, *2*, 611–620. [\[CrossRef\]](#)
4. Famous, K.R.; Delucchi, K.; Ware, L.B.; Kangelaris, K.N.; Liu, K.D.; Thompson, B.T.; Calfee, C.S. Acute Respiratory Distress Syndrome Subphenotypes Respond Differently to Randomized Fluid Management Strategy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2017**, *195*, 331–338. [\[CrossRef\]](#)
5. Van der Zee, P.; Rietdijk, W.; Somhorst, P.; Endeman, H.; Gommers, D. A Systematic Review of Biomarkers Multivariately Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome Development and Mortality. *Crit. Care* **2020**, *24*, 243. [\[CrossRef\]](#)

6. Bendib, I.; Beldi-Ferchiou, A.; Schlemmer, F.; Surenaud, M.; Maitre, B.; Plonquet, A.; Carreaux, G.; Razazi, K.; Godot, V.; Hùe, S.; et al. Alveolar Compartmentalization of Inflammatory and Immune Cell Biomarkers in Pneumonia-Related ARDS. *Crit. Care* **2021**, *25*, 23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Venet, F.; Lukaszewicz, A.-C.; Payen, D.; Hotchkiss, R.; Monneret, G. Monitoring the Immune Response in Sepsis: A Rational Approach to Administration of Immunoadjuvant Therapies. *Curr. Opin. Immunol.* **2013**, *25*, 477–483. [\[CrossRef\]](#)
8. Wu, J.-F.; Ma, J.; Chen, J.; Ou-Yang, B.; Chen, M.-Y.; Li, L.-F.; Liu, Y.-J.; Lin, A.-H.; Guan, X.-D. Changes of Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR Expression as a Reliable Predictor of Mortality in Severe Sepsis. *Crit. Care* **2011**, *15*, R220. [\[CrossRef\]](#)
9. Wu, H.-P.; Shih, C.-C.; Lin, C.-Y.; Hua, C.-C.; Chuang, D.-Y. Serial Increase of IL-12 Response and Human Leukocyte Antigen-DR Expression in Severe Sepsis Survivors. *Crit. Care* **2011**, *15*, R224. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Zhao, Y.; Jia, Y.; Li, C.; Shao, R.; Fang, Y. Predictive Value of Soluble Programmed Death-1 for Severe Sepsis and Septic Shock During the First Week in an Intensive Care Unit. *Shock* **2019**, *51*, 289–297. [\[CrossRef\]](#)
11. Monneret, G.; Lepape, A.; Venet, F. A Dynamic View of MHLA-DR Expression in Management of Severe Septic Patients. *Crit. Care* **2011**, *15*, 198. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Hotchkiss, R.S.; Monneret, G.; Payen, D. Immunosuppression in Sepsis: A Novel Understanding of the Disorder and a New Therapeutic Approach. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 260–268. [\[CrossRef\]](#)
13. Monneret, G.; Demaret, J.; Gossez, M.; Reverdiau, E.; Malergue, F.; Rimmelé, T.; Venet, F. Novel Approach in Monocyte Intracellular TNF Measurement: Application to Sepsis-Induced Immune Alterations. *Shock* **2017**, *47*, 318–322. [\[CrossRef\]](#)
14. Wolk, K.; Döcke, W.-D.; von Baehr, V.; Volk, H.-D.; Sabat, R. Impaired Antigen Presentation by Human Monocytes during Endotoxin Tolerance. *Blood* **2000**, *96*, 218–223. [\[CrossRef\]](#)
15. Biswas, S.K.; Lopez-Collazo, E. Endotoxin Tolerance: New Mechanisms, Molecules and Clinical Significance. *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 475–487. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Landelle, C.; Lepape, A.; Voirin, N.; Tognet, E.; Venet, F.; Bohé, J.; Vanhems, P.; Monneret, G. Low Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR Is Independently Associated with Nosocomial Infections after Septic Shock. *Intensive Care Med.* **2010**, *36*, 1859–1866. [\[CrossRef\]](#)
17. Monneret, G.; Lepape, A.; Voirin, N.; Bohé, J.; Venet, F.; Debard, A.-L.; Thizy, H.; Bienvenu, J.; Gueyffier, F.; Vanhems, P. Persisting Low Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR Expression Predicts Mortality in Septic Shock. *Intensive Care Med.* **2006**, *32*, 1175–1183. [\[CrossRef\]](#)
18. Cazalis, M.-A.; Friggeri, A.; Cavé, L.; Demaret, J.; Barbalat, V.; Cerrato, E.; Lepape, A.; Pachot, A.; Monneret, G.; Venet, F. Decreased HLA-DR Antigen-Associated Invariant Chain (CD74) mRNA Expression Predicts Mortality after Septic Shock. *Crit. Care* **2013**, *17*, R287. [\[CrossRef\]](#)
19. Hotchkiss, R.S.; Monneret, G.; Payen, D. Sepsis-Induced Immunosuppression: From Cellular Dysfunctions to Immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 862–874. [\[CrossRef\]](#)
20. Venet, F.; Monneret, G. Advances in the Understanding and Treatment of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* **2018**, *14*, 121–137. [\[CrossRef\]](#)
21. Gall, J.-R.L.; Lemeshow, S.; Saulnier, F. A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) Based on a European/North American Multicenter Study. *JAMA* **1993**, *270*, 2957–2963. [\[CrossRef\]](#)
22. Meyer, K.C.; Raghu, G.; Baughman, R.P.; Brown, K.K.; Costabel, U.; du Bois, R.M.; Drent, M.; Haslam, P.L.; Kim, D.S.; Nagai, S.; et al. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *185*, 1004–1014. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Poujol, F.; Monneret, G.; Pachot, A.; Textoris, J.; Venet, F. Altered T Lymphocyte Proliferation upon Lipopolysaccharide Challenge Ex Vivo. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144375. [\[CrossRef\]](#)
24. Yu, Y.-R.A.; Hotten, D.E.; Malakhau, Y.; Volker, E.; Ghio, A.J.; Noble, P.W.; Kraft, M.; Hollingsworth, J.W.; Gunn, M.D.; Tighe, R.M. Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2016**, *54*, 13–24. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhang, Y.; Zhou, Y.; Lou, J.; Li, J.; Bo, L.; Zhu, K.; Wan, X.; Deng, X.; Cai, Z. PD-L1 Blockade Improves Survival in Experimental Sepsis by Inhibiting Lymphocyte Apoptosis and Reversing Monocyte Dysfunction. *Crit. Care* **2010**, *14*, R220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Patil, N.K.; Bohannon, J.K.; Sherwood, E.R. Immunotherapy: A Promising Approach to Reverse Sepsis-Induced Immunosuppression. *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 688–702. [\[CrossRef\]](#)
27. Venet, F.; Lepape, A.; Monneret, G. Clinical Review: Flow Cytometry Perspectives in the ICU—from Diagnosis of Infection to Monitoring of Injury-Induced Immune Dysfunctions. *Crit. Care* **2011**, *15*, 231. [\[CrossRef\]](#)
28. Skirecki, T.; Mikaszewska-Sokolewicz, M.; Hoser, G.; Zielińska-Borkowska, U. The Early Expression of HLA-DR and CD64 Myeloid Markers Is Specifically Compartmentalized in the Blood and Lungs of Patients with Septic Shock. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 3074902. [\[CrossRef\]](#)
29. Patera, A.C.; Drewry, A.M.; Chang, K.; Beiter, E.R.; Osborne, D.; Hotchkiss, R.S. Frontline Science: Defects in Immune Function in Patients with Sepsis Are Associated with PD-1 or PD-L1 Expression and Can Be Restored by Antibodies Targeting PD-1 or PD-L1. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *100*, 1239–1254. [\[CrossRef\]](#)
30. Shao, R.; Fang, Y.; Yu, H.; Zhao, L.; Jiang, Z.; Li, C.-S. Monocyte Programmed Death Ligand-1 Expression after 374 Days of Sepsis Is Associated with Risk Stratification and Mortality in Septic Patients: A Prospective Cohort Study. *Crit. Care* **2016**, *20*, 124. [\[CrossRef\]](#)

31. Morrell, E.D.; Wiedeman, A.; Long, S.A.; Gharib, S.A.; West, T.E.; Skerrett, S.J.; Wurfel, M.M.; Mikacenic, C. Cytometry TOF Identifies Alveolar Macrophage Subtypes in Acute Respiratory Distress Syndrome. *JCI Insight* **2018**, *3*, e99281. [CrossRef]
32. Zhao, Z.; Wang, X.; Xie, J.; Chen, L.; Li, Q.; Wang, X.; Wang, J.; Deng, X. Therapeutic Effect of an Anti-Human Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Nanobody on Polymicrobial Sepsis in Humanized Mice. *Med. Sci. Monit.* **2021**, *27*, e926820-1–e926820-8. [CrossRef]
33. Monaghan, S.F.; Chung, C.-S.; Chen, Y.; Lomas-Neira, J.; Fairbrother, W.G.; Heffernan, D.S.; Cioffi, W.G.; Ayala, A. Soluble Programmed Cell Death Receptor-1 (SPD-1): A Potential Biomarker with Anti-Inflammatory Properties in Human and Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *J. Transl. Med.* **2016**, *14*, 312. [CrossRef] [PubMed]
34. Li, J.; Tang, Z.; Xie, M.; Hang, C.; Yu, Y.; Li, C. Association between Elevation of Plasma Biomarkers and Monocyte Dysfunction and Their Combination in Predicting Sepsis: An Observational Single-Centre Cohort Study. *Innate Immun.* **2020**, *26*, 514–527. [CrossRef]
35. Grimaldi, D.; Pradier, O.; Hotchkiss, R.S.; Vincent, J.-L. Nivolumab plus Interferon- γ in the Treatment of Intractable Mucormycosis. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 18. [CrossRef]
36. Hotchkiss, R.S.; Colston, E.; Yende, S.; Crouser, E.D.; Martin, G.S.; Albertson, T.; Bartz, R.R.; Brakenridge, S.C.; Delano, M.J.; Park, P.K.; et al. Immune Checkpoint Inhibition in Sepsis: A Phase 1b Randomized Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Nivolumab. *Intensive Care Med.* **2019**, *45*, 1360–1371. [CrossRef]
37. Santos, S.S.; Carmo, A.M.; Brunialti, M.K.C.; Machado, F.R.; Azevedo, L.C.; Assunção, M.; Trevelin, S.C.; Cunha, F.Q.; Salomao, R. Modulation of Monocytes in Septic Patients: Preserved Phagocytic Activity, Increased ROS and NO Generation, and Decreased Production of Inflammatory Cytokines. *Intensive Care Med. Exp.* **2016**, *4*, 5. [CrossRef]
38. del Fresno, C.; García-Río, F.; Gómez-Piña, V.; Soares-Schanoski, A.; Fernández-Ruiz, I.; Jurado, T.; Kajiji, T.; Shu, C.; Marín, E.; Gutierrez del Arroyo, A.; et al. Potent Phagocytic Activity with Impaired Antigen Presentation Identifying Lipopolysaccharide-Tolerant Human Monocytes: Demonstration in Isolated Monocytes from Cystic Fibrosis Patients. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 6494–6507. [CrossRef]
39. Monneret, G.; Finck, M.-E.; Venet, F.; Debar, A.-L.; Bohé, J.; Bienvenu, J.; Lepape, A. The Anti-Inflammatory Response Dominates after Septic Shock: Association of Low Monocyte HLA-DR Expression and High Interleukin-10 Concentration. *Immunol. Lett.* **2004**, *95*, 193–198. [CrossRef]
40. Cavaillon, J.-M.; Adib-Conquy, M. Bench-to-Bedside Review: Endotoxin Tolerance as a Model of Leukocyte Reprogramming in Sepsis. *Crit. Care* **2006**, *10*, 233. [CrossRef]
41. Monneret, G.; Venet, F.; Pachot, A.; Lepape, A. Monitoring Immune Dysfunctions in the Septic Patient: A New Skin for the Old Ceremony. *Mol. Med.* **2008**, *14*, 64–78. [CrossRef] [PubMed]
42. Fumeaux, T.; Pugin, J. Role of Interleukin-10 in the Intracellular Sequestration of Human Leukocyte Antigen-DR in Monocytes during Septic Shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2002**, *166*, 1475–1482. [CrossRef] [PubMed]
43. Shalova, I.N.; Lim, J.Y.; Chittechath, M.; Zinkernagel, A.S.; Beasley, F.; Hernández-Jiménez, E.; Toledano, V.; Cubillos-Zapata, C.; Rapisarda, A.; Chen, J.; et al. Human Monocytes Undergo Functional Re-Programming during Sepsis Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Immunity* **2015**, *42*, 484–498. [CrossRef] [PubMed]
44. Seidler, S.; Zimmermann, H.W.; Bartneck, M.; Trautwein, C.; Tacke, F. Age-Dependent Alterations of Monocyte Subsets and Monocyte-Related Chemokine Pathways in Healthy Adults. *BMC Immunol.* **2010**, *11*, 30. [CrossRef] [PubMed]

4. Article 4: Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome

Sophie Hue ; Asma Beldi-Ferchiou*, **Inès Bendib***, Mathieu Surenaud, Slim Fourati, Thomas Frapard, Simon Rivoal, Keyvan Razazi, Guillaume Cardeaux, Marie-Hélène Delfau-Larue, Armand Mekontso-Dessap, Etienne Audureau et Nicolas de Prost.

Am J Respir Crit Care Med 2020 1;202(11):1509–1519.

*Contribution égale

La pandémie liée au virus du syndrome respiratoire aigu sévère-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) a rapidement touché plus de 469 millions de personnes dans le monde, dont 6 millions de décès [381]. Les formes les plus sévères de COVID-19 nécessitant l'admission en soins intensif réalisent un tableau d'insuffisance respiratoire aiguë et de SDRA (15%–35%) [382]. Le système immunitaire joue un double rôle dans la COVID-19 grave : il contribue à la fois à l'élimination du virus via les réponses immunes innées et adaptatives, mais l'échappement virologique des patients les plus sévères entraîne une intensification de cette réponse immune, associée au développement du SDRA et des autres défaillances d'organes [383].

Dans le contexte de la 1^{ère} vague de COVID-19, nous avons mené une étude monocentrique observationnelle prospective afin de comparer l'immunopathologie du SDRA COVID-19 avec celle du SDRA non COVID-19 et identifier d'éventuels biomarqueurs associés à la mortalité chez les patients COVID-19. Compte tenu des particularités de l'infection SARS-CoV-2 et des recommandations en vigueur à l'époque, il n'a pas été réalisé de prélèvement alvéolaire dans cette étude. Trente-huit patients immunocompétents admis en réanimation entre le 8 et le 30 mars 2020 pour un SDRA COVID-19 étaient inclus et comparés à 36 patients atteints de SDRA non COVID-19. Par rapport aux patients atteints de SDRA non COVID-19, ceux atteints de COVID-19 présentaient une mortalité à J28 plus élevée (34 % contre 11 %). Sur le plan immunologique, les patients COVID-19 présentaient une lymphopénie T CD4+, T CD8+ et B plus profonde et soutenue. L'expression d'HLA-DR était plus élevée sur les monocytes circulants (**Figure 1** de l'article) des patients COVID-19 -et aussi chez les patients atteints de

SDRA secondaires aux pneumonies virales non SARS-CoV-2- que chez les patients ayant un SDRA secondaire à une pneumonie bactérienne (**Figure E3** du supplément en ligne de l'article, **page 225 du manuscrit**). Les patients COVID-19 présentaient des concentrations sériques plus élevées d'EGF (facteur de croissance épithélial), GM-CSF, IL-10, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES et CCL20/MIP-3 α (**Figure 2** de l'article). Des concentrations sériques accrues de CXCL10/IP-10 et GM-CSF, ainsi qu'une charge virale SARS-CoV-2 nasopharyngée plus élevée, étaient associées à la mortalité à J28 chez les patients COVID-19. Une lymphopénie profonde et une « signature de chimiokines » (associant CXCL10/IP-10 et GM-CSF, **Figure 3** de l'article) étaient caractéristiques du SDRA COVID-19.

ORIGINAL ARTICLE

Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome

Sophie Hue^{1,2,3,4}, Asma Beldi-Ferchiou^{1*}, Inés Bendib^{4,5,6*}, Mathieu Surenaud³, Slim Fourati^{4,7,8}, Thomas Frapard⁹, Simon Rivoal⁹, Keyvan Razazi^{4,5,6}, Guillaume Carteaux^{4,5,6}, Marie-Hélène Delfau-Larue^{1,2,3,4}, Armand Mekontso-Dessap^{4,5,6}, Etienne Audureau^{9,10}, and Nicolas de Prost^{4,5,6}

¹Département Immunologie-Hématologie Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, ²Médecine Intensive Réanimation, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, ³Laboratoire de Virologie, Département de Prévention, Diagnostic et Traitement des Infections, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, and ¹⁰Département de Santé Publique, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Créteil, France; ⁴INSERM U955 Team 16, Créteil, France; ⁵Vaccine Research Institute, Faculté de Médecine, Université Paris Est Créteil, Créteil, France; ⁶Université Paris-Est Créteil Val de Marne, INSERM U955, Créteil, France; ⁷Groupe de Recherche Clinique CARMAS, Université Paris Est-Créteil, Créteil, France; ⁸INSERM U955 Team "Virus Hepatology Cancer," Créteil, France; and ⁹INSERM U955 Team CEPIA, University Paris Est Créteil, Créteil, France

ORCID ID: 0000-0002-4833-4320 (N.d.P.).

Abstract

Rationale: Uncontrolled inflammatory innate response and impaired adaptive immune response are associated with clinical severity in patients with coronavirus disease (COVID-19).

Objectives: To compare the immunopathology of COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS) with that of non-COVID-19 ARDS, and to identify biomarkers associated with mortality in patients with COVID-19 ARDS.

Methods: Prospective observational monocenter study. Immunocompetent patients diagnosed with RT-PCR-confirmed severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection and ARDS admitted between March 8 and March 30, 2020, were included and compared with patients with non-COVID-19 ARDS. The primary clinical endpoint of the study was mortality at Day 28. Flow cytometry analyses and serum cytokine measurements were performed at Days 1–2 and 4–6 of ICU admission.

Measurements and Main Results: As compared with patients with non-COVID-19 ARDS ($n = 36$), those with COVID-19 ($n = 38$) were not significantly different regarding age, sex, and

Sequential Organ Failure Assessment and Simplified Acute Physiology Score II scores but exhibited a higher Day-28 mortality (34% vs. 11%, $P = 0.030$). Patients with COVID-19 showed profound and sustained T CD4⁺ ($P = 0.002$), CD8⁺ ($P < 0.0001$), and B ($P < 0.0001$) lymphopenia, higher HLA-DR expression on monocytes ($P < 0.001$) and higher serum concentrations of EGF (epithelial growth factor), GM-CSF, IL-10, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, and CCL20/MIP-3a. After adjusting on age and Sequential Organ Failure Assessment, serum CXCL10/IP-10 ($P = 0.047$) and GM-CSF ($P = 0.050$) were higher and nasopharyngeal RT-PCR cycle threshold values lower ($P = 0.010$) in patients with COVID-19 who were dead at Day 28.

Conclusions: Profound global lymphopenia and a "chemokine signature" were observed in COVID-19 ARDS. Increased serum concentrations of CXCL10/IP-10 and GM-CSF, together with higher nasopharyngeal SARS-CoV-2 viral load, were associated with Day-28 mortality.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; ARDS; chemokines; cytokines

(Received in original form May 17, 2020; accepted in final form August 31, 2020)

†This article is open access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives License 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). For commercial usage and reprints, please contact Diane Gern (dgern@thoracic.org).

*These authors contributed equally to this work.

Supported by the 2013 Clinical Research Grant of the French Intensive Care Society.

Author Contributions: S.H., A.B.-F., E.A., and N.d.P. conceptualized and designed the study, supervised and analyzed the data, wrote the manuscript, and gave approval of the final version to be submitted. S.H., A.B.-F., and M.S. performed lab experiments, reviewed the manuscript, and gave approval of the final version to be submitted. I.B., T.F., and S.R. collected the clinical data, reviewed the manuscript, and gave approval of the final version to be submitted. S.F., K.R., M.-H.D.-L., G.C., and A.M.-D. reviewed the manuscript and gave approval of the final version to be submitted.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Nicolas de Prost, M.D., Ph.D., Service de Médecine Intensive Réanimation, Hôpital Henri Mondor, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil, France. E-mail: nicolas.de-prost@ephp.fr

This article has a related editorial.

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org.

Am J Respir Crit Care Med Vol 202, Iss 11, pp 1509–1519, Dec 1, 2020

Copyright © 2020 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.202005-1885OC on August 31, 2020

Internet address: www.atsjournals.org

At a Glance Commentary

Scientific Knowledge on the Subject:

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infections leading to coronavirus disease (COVID-19) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) are associated with high mortality and prolonged durations of ICU stay. Profound lymphopenia and elevated serum levels of proinflammatory cytokines, also characterized as cytokine storm, have been associated with clinical severity. However, few data compared the immunopathology of COVID-19 ARDS with that of non-COVID-19 ARDS, so specific traits of the immune responses to severe SARS-CoV-2 infections have not been well identified.

What This Study Adds to the Field:

Patients with COVID-19 ARDS showed a phenotype of impaired adaptive immune response with profound lymphopenia and impaired/delayed lymphocyte activation. We also report a “chemokine signature” with increased serum concentrations of IP-10 and GM-CSF in patients with COVID-19. Serum concentrations of IP-10 and GM-CSF and nasopharyngeal viral loads were associated with outcomes in patients with COVID-19. Such results highlight the contribution of myeloid cells and impaired adaptive immune response with associated viral immune evasion to pathogenic inflammation during SARS-CoV-2 infection, suggesting that these could be potential targets for pharmacological manipulations.

The pandemic of coronavirus disease (COVID-19) caused by the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) represents the greatest global public health crisis that occurred during the last decades. Among hospitalized patients, up to 42% will develop acute respiratory failure/acute respiratory distress syndrome (ARDS) and require ICU admission, with an in-ICU mortality rate of 52% in the recently published cohort of Wu and colleagues (1). The cornerstone of

clinical treatment consists in supportive care, relying primarily on mechanical ventilation support and management of associated organ failures. Although a large number of interventional trials are ongoing, assessing the effect either of antivirals or of treatments that aim at mitigating the immunopathology of the infection, no therapeutic intervention has been approved for COVID-19 so far. Better understanding the pathophysiology of severe SARS-CoV-2 infection is thus a crucial step to better identify therapeutic interventions most likely to mitigate the course of the disease and to have an impact on patient outcomes.

SARS-CoV-2 infection seems to trigger peculiar innate and adaptive immune responses. Profound lymphopenia and increased neutrophil-to-lymphocyte ratio have been shown to be associated with clinical severity (2), and elevated serum levels of proinflammatory cytokines, also characterized as cytokine storm, have been reported as potential mediators of respiratory/multiple organ failure (3). Indeed, elevated levels of IL-6 were found to be associated with poor outcome in patients with COVID-19-associated ARDS (4). A pattern of immune dysregulation associating IL-6-mediated low HLA-DR (human leukocyte antigen D-related) expression on circulating monocytes, together with sustained lymphopenia and hyperinflammation, was recently put forward (5). Yet, few data compared the immunopathology of COVID-19 ARDS with that of non-COVID-19 ARDS, so specific traits of the immune responses to severe SARS-CoV-2 infections have not been well identified. Whether the magnitude of the so-called cytokine storm reported in severe SARS-CoV-2 infection exceeds that characterizing bacterial sepsis, for instance, has been challenged (6, 7), and a profound depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells is also a common feature of septic shock (8).

We thus conducted a monocenter prospective study that aimed at 1) comparing the immunopathology of COVID-19 ARDS with that of non-COVID-19 ARDS and 2) identifying biomarkers associated with mortality in patients with COVID-19 ARDS. We show that major differences involving both the innate and the adaptive immune responses characterize severe SARS-CoV-2 infection.

Methods

Additional methods are available in the online supplement.

Study Design and Patients

This is a prospective observational monocenter study, which included all nonimmunocompromised patients diagnosed with RT-PCR-confirmed SARS-CoV-2 infection and ARDS (Berlin definition (9), COVID-19 ARDS group) consecutively admitted in the medical ICU at Henri Mondor Hospital, Créteil, France, between March 8, 2020, and March 30, 2020. Patients with pneumonia-associated ARDS previously included in a historical monocenter prospective cohort between January 2014 and December 2018 were used as controls (non-COVID-19 ARDS group; see the flow chart in Figure E1 in the online supplement) (10). The study has received the approbation of an institutional review board (Comité de Protection des Personnes Ile de France II; reference number: 3675-NI; and Comité de Protection des Personnes Ile de France V; reference number: 13899). Informed consent was obtained from all patients or their relatives.

Patients with ARDS received mechanical ventilation using a standardized protective ventilation strategy (11) and were managed according to national guidelines (12).

Data Collection

Demographics and clinical and laboratory variables were recorded upon ICU admission, at samples collection time points, and during ICU stay. The primary clinical endpoint of the study was Day-28 mortality.

Flow Cytometry Analyses

Blood samples were collected within 48 hours of ICU admission (Days 1–2 sample) and 4 days thereafter (Days 4–6 sample). Fresh whole blood was stained with different combinations of the following conjugated monoclonal antibodies: anti-CD4-PE, anti-CD3-AA750, anti-CD8-AA700, anti-CD38-PC5.5 or isotype control, anti-CD279 (PD-1)-PC7 or isotype control, anti-HLA-DR-PB or isotype control, anti-CD14-ECD, and CD45-Krome Orange (Beckman Coulter). Acquisition was performed on a

Table 1. Characteristics of Patients with COVID-19 (n = 38) and Non-COVID-19 (n = 36) ARDS

Variables	Available Data	COVID-19 ARDS (n = 38)	Non-COVID-19 ARDS (n = 36)	P Value
Demographics and comorbidities				
Age	74	63 (50–72)	58 (44–70)	0.443
Sex, M	74	32 (84)	28 (78)	0.480
BMI, kg/cm ²	73	27.9 (25.6–32.7)	26.7 (22.6–31.0)	0.117
Obesity	74	13 (36)	5 (14)	0.029
Diabetes mellitus	74	12 (32)	7 (19)	0.232
COPD	74	5 (13)	7 (19)	0.463
Chronic heart failure	74	6 (16)	7 (19)	0.680
Liver cirrhosis	74	0 (0)	2 (6)	0.141
Sickle cell disease	74	1 (3)	4 (11)	0.143
End-stage renal disease	74	1 (3)	0 (0)	0.327
Smoker	74	15 (39)	16 (44)	0.665
Patients' characteristics upon ICU admission				
First symptom to admission*, d	74	6 (3–8)	3 (0–7)	0.007
SOFA	74	9 (6–10)	9 (6–11)	0.483
SAPS II	74	38 (32–45)	39 (31–54)	0.808
Invasive mechanical ventilation	74	25 (66)	20 (56)	0.476
Temperature	72	38.0 (38.0–40.0)	38.6 (37.8–39.6)	0.634
ARDS severity (Berlin)	74			0.007
Mild		9 (24)	1 (3)	
Moderate		18 (47)	14 (39)	
Severe		11 (29)	21 (58)	
Pa _{O₂} /Fi _{O₂} ratio, mm Hg	74	125 (94–169)	94 (72–129)	0.025
P _{aCO₂} , mm Hg	74	40 (37–48)	45 (39–51)	0.168
pH	74	7.42 (7.32–7.45)	7.36 (7.27–7.42)	0.039
Left ventricle ejection fraction, %	74	61 (52–70)	60 (50–60)	0.030
Arterial blood lactates, mM	74	1.4 (1.2–1.9)	1.4 (0.8–2.2)	0.695
Creatinine, μmol/L	74	82 (66–120)	87 (65–144)	0.455
Alanine aminotransferase, IU/L	74	36 (22–47)	45 (24–100)	0.137
Aspartate aminotransferase, IU/L	74	51 (41–85)	62 (29–145)	0.552
Bilirubin, μmol/L	74	9 (7–11)	14 (8–21)	0.013
Prothrombin time, %	74	80 (72–87)	77 (61–87)	0.222
WBC counts, 10 ³ /mm ³	74	7.3 (5.6–9.8)	12.8 (8.3–19.0)	<0.001
Lymphocytes, 10 ³ /mm ³	73	0.6 (0.5–0.9)	0.9 (0.6–1.2)	0.035
Monocytes, 10 ³ /mm ³	73	0.3 (0.2–0.4)	0.7 (0.2–1.2)	0.008
Neutrophils, 10 ³ /mm ³	73	6.4 (4.2–8.6)	10.5 (7.2–16.2)	<0.001
Neutrophils-to-lymphocytes ratio	73	8.8 (5.5–15.2)	11.1 (8.3–18.7)	0.167
Neuromuscular blockers	74	24 (63)	30 (83)	0.051
Prone position	74	13 (34)	13 (36)	0.664
Nitric oxide	74	0 (0)	2 (6)	0.141
ECMO	74	0 (0)	2 (6)	0.141
Vasopressor support	74	22 (58)	25 (69)	0.302
Microbiological documentation (other than SARS-CoV-2)	74	9 (24)	24 (67)	0.0002
Bacteria				
Gram positive				
<i>Staphylococcus aureus</i>		1	1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		0	5	
Group A <i>Streptococcus</i>		0	2	
Gram negative				
Enterobacteriaceae		3	7	
Nonfermenting bacteria		2	1	
<i>Haemophilus influenzae</i>		0	2	
Intracellular pathogens				
<i>Legionella pneumophila</i>		0	4	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		0	2	
Virus (other than SARS-CoV-2)		2 (5)	11 [†] (30)	0.005
Influenza		0	6 [‡]	
Rhinovirus		2	1	
Others		0	4 [§]	

Definition of abbreviations: ARDS=acute respiratory distress syndrome; BMI=body mass index; COPD=chronic obstructive pulmonary disease; COVID-19=coronavirus disease; ECMO=extracorporeal membrane oxygenation; SOFA=Sequential Organ Failure Assessment; SAPS II=Simplified Acute Physiology Score II; SARS-CoV-2=severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; WBC=white blood cell.

Continuous variables are presented as median (first-third quartiles); P values come from the Mann-Whitney test. Categorical variables are shown as n (%). P values come from the chi-square or the Fisher exact test, as appropriate. Bold results are statistically significant at the P < 0.05 level.

*Time lag between the first symptoms of the disease and ICU admission.

[†]Including three patients who had bacterial coinfections (group A *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae*).

[‡]Influenza A(H1N1)pdm2009 (n=4) and Influenza B (n=2).

[§]Seasonal coronavirus (n=1), adenovirus (n=1), metapneumovirus (n=1), and respiratory syncytial virus (n=1).

Table 2. Outcomes of Patients with COVID-19 (*n* = 38) and Non-COVID-19 (*n* = 36) ARDS

Variables	COVID-19 ARDS (<i>n</i> = 38)	Non-COVID-19 ARDS (<i>n</i> = 36)	<i>P</i> Value
First symptom to first sample ^a , d	10 (7–12)	7 (4–11)	0.200
First symptom to second sample ^b , d	14 (9–15)	11 (9–16)	0.995
Invasive mechanical ventilation	37 (97)	36 (100)	>0.99
ICU admission to intubation ^c , d	0 (0–2)	0 (0–2)	0.492
VAP			
>1 VAP episode	29 (76)	15 (42)	0.002
Intubation to first VAP episode ^d , d	8 (6–10)	9 (5–11)	0.794
>2 VAP episodes	19 (50)	6 (17)	0.002
Intubation to second VAP episode ^e , d	14 (12–17)	21 (11–24)	0.176
Other ICU-acquired infections	6 (15.8)	1 (2.8)	0.108
Catheter-related infection	5 (13.1)	1 (2.8)	—
Urinary tract infection	1 (2.6)	0 (0)	—
Shock dose steroids	13 (36)	12 (33)	0.804
Shock	29 (76)	25 (69)	0.506
Renal replacement therapy	21 (55)	15 (42)	0.242
ECMO	10 (26)	8 (22)	0.682
Organ failure-free days at Day 28, d	0 (0–15)	14 (0–20)	0.003
Day-28 mortality	13 (34)	4 (12)	0.030
ICU mortality	14 (37)	7 (19)	0.007

Definition of abbreviations: ARDS = acute respiratory distress syndrome; COVID-19 = coronavirus disease; ECMO = extracorporeal membrane oxygenation; VAP = ventilator-associated pneumonia.

Continuous variables are presented as median (first–third quartiles); *P* values come from the Mann-Whitney test. Categorical variables are shown as *n* (%). *P* values come from the chi-square or the Fisher exact test, as appropriate. Bold results are statistically significant at the *P* < 0.05 level.

^aTime lag between the first symptom of the disease and the first sample drawn for flow cytometry analysis/cytokine measurements.

^bTime lag between the first symptom of the disease and the second sample drawn for flow cytometry analysis/cytokine measurements.

^cTime lag between ICU admission and orotracheal intubation.

^dTime lag between orotracheal intubation and the first episode of ventilator-associated pneumonia.

^eTime lag between orotracheal intubation and the second episode of ventilator-associated pneumonia.

10-multicolor Navios flow cytometer and analyzed with the Kaluza 2.1 software (Beckman Coulter). Gating strategies are depicted in Figure E2.

Measurements of Serum Cytokine Concentrations

Cytokines concentrations were measured in serum inactivated for 20 minutes at 56°C (13) using Luminex multiplex bead-based technology (R&D Systems) and a Bio-Plex 200 instrument (BioRad), on serum diluted to 1/2.

SARS-CoV-2 Detection Genome in Nasopharyngeal Swabs

Nasopharyngeal swabs were processed for RNA extraction with the QIAasympyony platform. Real-time RT-PCR was performed using RealStar SARS-CoV-2 RT-PCR kit 1.0 (Altona) on a LightCycler 480 plate-based real-time PCR platform. The cycle threshold values of RT-PCR were used as indicators of the viral load of SARS-CoV-2 RNA in specimens.

Statistical Analyses

Descriptive results are presented as means (\pm SD) or medians (first–third quartiles) for continuous variables, and as numbers with percentages for categorical variables. Bivariate correlation analyses between cytokines and COVID-19 status were conducted by computing Spearman and biserial correlation coefficients for continuous–continuous and binary–continuous variable correlations, respectively.

Unadjusted between-groups comparisons between conditions (COVID-19 vs. non-COVID-19) and outcome (alive vs. dead at ICU Day 28) were performed using Mann-Whitney tests for continuous variables, and chi-square or Fisher's exact tests for categorical variables, as appropriate. Association between cytokines, other covariates, and final outcome were further assessed after systematically adjusting for age and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score, using logistic regression (categorical variables) and linear regression modeling (continuous variables). Longitudinal analyses were performed to

assess the temporal evolution of cytokines levels over a 12-day period using mixed-effects linear regression models.

Two-tailed *P* values < 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using Stata V16.0 statistical software (StataCorp), and R 3.6.3 (R Foundation for Statistical Computing, *corplot* and *agraph* packages).

Results

Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with COVID-19 ARDS and Non-COVID-19 ARDS

Thirty-eight patients were admitted in the ICU for severe SARS-CoV-2 infection and ARDS within the study period. As compared with patients with non-COVID-19 ARDS (*n* = 36), patients with COVID-19 did not show significant differences regarding age, sex, associated comorbidities except for more frequent obesity, severity scores (i.e., SOFA and Simplified Acute Physiology Score II), and invasive

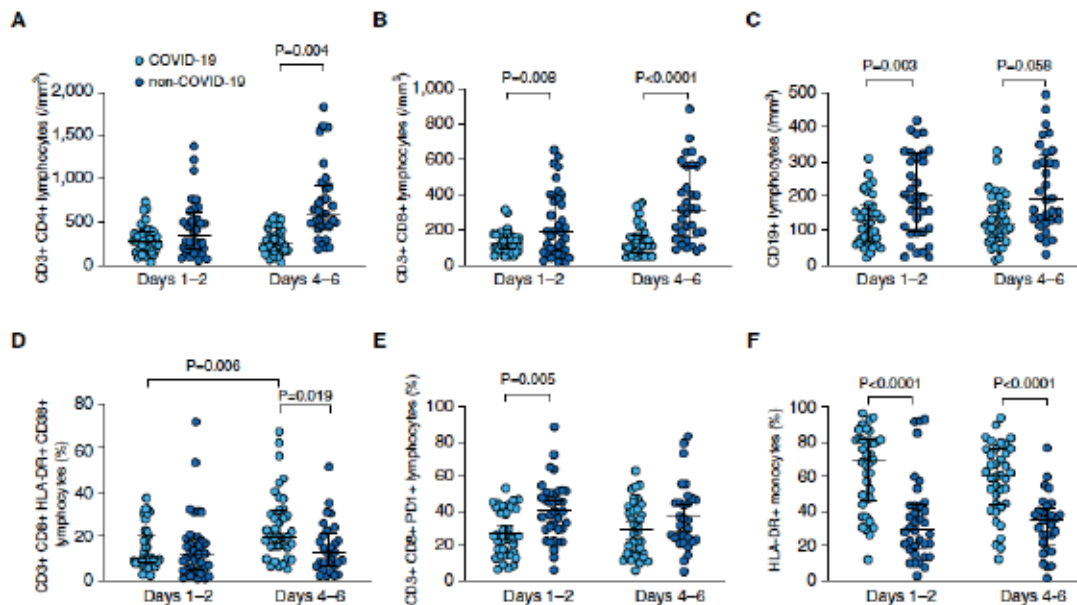


Figure 1. Flow cytometry analysis of lymphocyte subsets and monocytes in patients with (light blue) and without (dark blue) coronavirus disease (COVID-19) at Days 1–2 and Days 4–6 of ICU admission. (A) Blood T CD4⁺ lymphocyte counts; there was a significant effect of COVID-19 status ($P=0.002$) but not of time point ($P=0.091$) and no significant interaction (COVID-19 status \times time point, $P=0.074$) by two-way ANOVA. (B) Blood T CD8⁺ lymphocyte counts; there was a significant effect of COVID-19 status ($P<0.0001$) but not of time point ($P=0.108$) and no significant interaction (COVID-19 status \times time point, $P=0.162$) by two-way ANOVA. (C) Blood B (CD19⁺) lymphocyte counts; there was a significant effect of COVID-19 status ($P<0.0001$) but not of time point ($P=0.578$) and no significant interaction (COVID-19 status \times time point, $P=0.540$) by two-way ANOVA. (D) Percentage of T CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ lymphocytes; there was a significant effect of COVID-19 status ($P=0.048$) but not of time point ($P=0.025$), with a significant interaction (COVID-19 status \times time point, $P=0.024$) by two-way ANOVA. (E) Percentage of T CD8⁺PD1⁺ lymphocytes; there was a significant effect of COVID-19 status ($P<0.001$) but not of time point ($P=0.753$) and no significant interaction (COVID-19 status \times time point, $P=0.293$) by two-way ANOVA. (F) Percentage of HLA-DR⁺ monocytes; there was a significant effect of COVID-19 status ($P<0.0001$) but not of time point ($P=0.252$) and no significant interaction (COVID-19 status \times time point, $P=0.630$) by two-way ANOVA. P values indicated on the figure come from the Sidak *post hoc* test.

mechanical ventilation support upon ICU admission (Table 1). Yet, patients with COVID-19 had less severe ARDS than their non-COVID-19 counterparts, as reflected by Berlin definition categorization and higher values of P_{aO_2}/F_{iO_2} , obtained within 24 hours of ICU admission. In keeping with previous findings (2, 5), patients with COVID-19 showed more pronounced lymphopenia and monocytopenia, whereas those without COVID-19 had more blood neutrophils (Table 1). As expected, more bacterial and non-SARS-CoV-2 viral infections were documented in patients without COVID-19 upon ICU admission.

Patients with COVID-19 ARDS showed dramatic outcome differences as compared with patients with non-COVID-19

ARDS, with significantly more frequent ventilator-acquired pneumonias, fewer organ failure-free days, and eventually higher Day-28 and ICU mortality (Table 2).

Blood Lymphocyte Counts and CD38 and HLA-DR Expression Underline Distinct Immune Phenotype in Patients with and without COVID-19

Lymphopenia is a common feature in patients with severe COVID-19 and is associated with clinical severity and outcome (5, 14, 15). Although absolute T CD4⁺ lymphocyte counts were not significantly different between groups at Days 1–2, patients with COVID-19 showed lower counts than others at Days 4–6 (Figure 1A). Regarding T CD8⁺ and B-cell counts, patients with COVID-19

displayed deep and sustained lymphopenia with significantly lower values than those without COVID-19 at both time points (Figures 1B and 1C). Interestingly, patients with COVID-19 even displayed significantly lower B-cell counts than patients with non-COVID-19 ARDS diagnosed with viral pulmonary infections (Figure E3).

The coexpression of CD38 and HLA-DR on CD8⁺ T cells, a hallmark of activation during viral infections (16, 17), was not significantly different between groups at Days 1–2 but increased in patients with COVID-19 with time and was eventually higher in patients with COVID-19 than in others at Days 4–6 (Figure 1D). PD-1 expression on CD8⁺ T cells, which has been shown to be associated with immune dysfunction and poor outcome in sepsis (18), was lower at

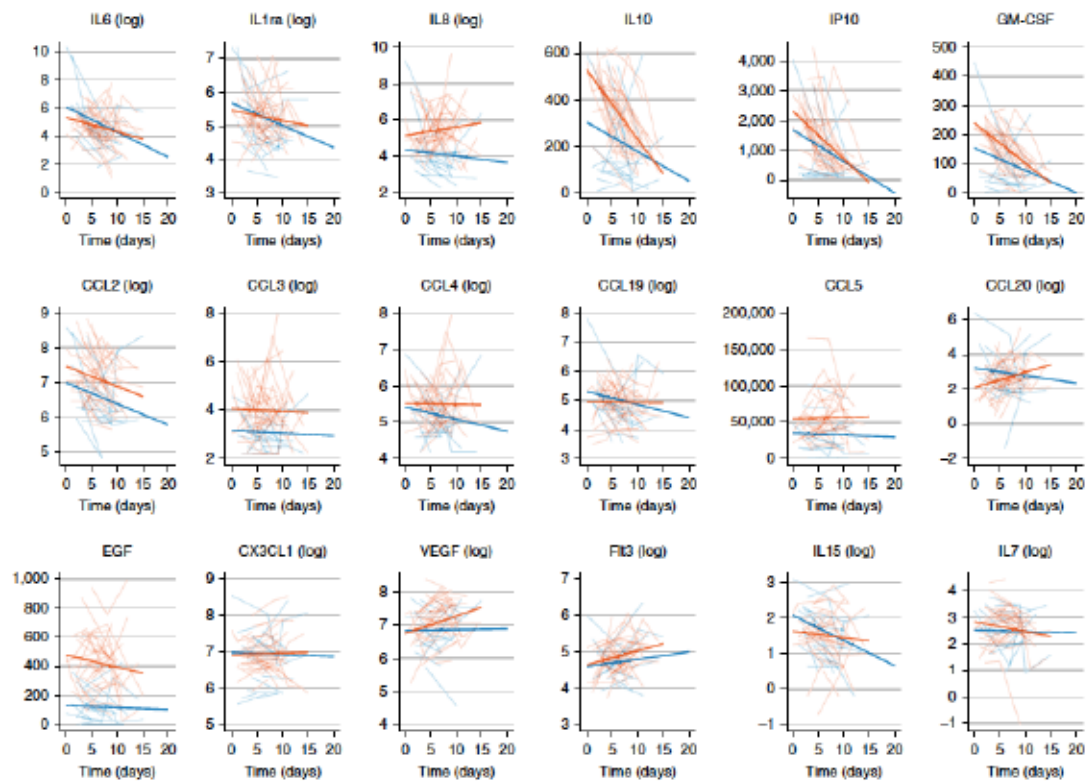


Figure 2. Evolution of serum concentrations of cytokines over time in patients with coronavirus disease (COVID-19) (thick red lines) and non-COVID-19 (thick blue lines) acute respiratory distress syndrome. The y-axis represents serum concentrations expressed in log ng/ml. Individual trajectories of patients with (thin red lines) and without (thin blue lines) COVID-19 are represented in the background. The x-axis represents the time elapsed since hospital admission (Day 0).

Days 1–2 in patients with COVID-19 than in others (Figure 1E), with significantly lower PD-1 expression in patients with COVID-19 than in their non-COVID-19 viral ARDS counterparts (Figure E3). In line with this result, HLA-DR expression on monocytes was dramatically higher in patients with COVID-19 as compared with those without COVID-19 at both time points (Figure 1F). In fact, HLA-DR expression on monocytes was significantly lower in patients with viral (COVID-19 or not) ARDS than in those with bacterial or nondocumented ARDS (Figure E3).

Patients with and without COVID-19 Exhibit Different Profiles of Cytokine Storm

No significant differences were observed regarding the time course of serum concentrations of IL-6 and IL-1Ra between

patients with and without COVID-19. However, the serum concentrations of these cytokines were significantly impacted by the time elapsed since hospital admission (Figure 2 and Table E1) or since first symptoms of disease onset (Figure E4 and Table E2). As such, the concentrations kept steady or increased with time for CCL4/MIP-1b, CCL20/MIP-3a, IL-15, and IL-8 in patients with COVID-19, whereas they decreased in others. The serum concentrations of IL-10, an antiinflammatory cytokine, were significantly higher in patients with COVID-19 than in others, with a decreasing time course, with significant interactions between time and COVID-19 status, indicating that the time course of this cytokine was different between groups.

A chemokine response has been described in the respiratory tract of patients with SARS-CoV-2. We observed this “chemokine signature” in the blood of patients with COVID-19. Indeed, higher levels of CCL3/MIP-1a, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, and CCL20/MIP-3a were measured in patients with COVID-19 than in their non-COVID-19 counterparts (Figures 2 and E3 and Tables E1 and E2). Interestingly, the concentrations of CCL19/MIP/3b, CCL20/MIP-3a, and CCL5/RANTES, which recruit monocytes and T cells, remained stable over time. These chemokines are secreted by CD14⁺CD16⁺ inflammatory monocytes, which are enriched in the blood of patients with COVID-19 with severe disease (19). In line with this observation, the serum

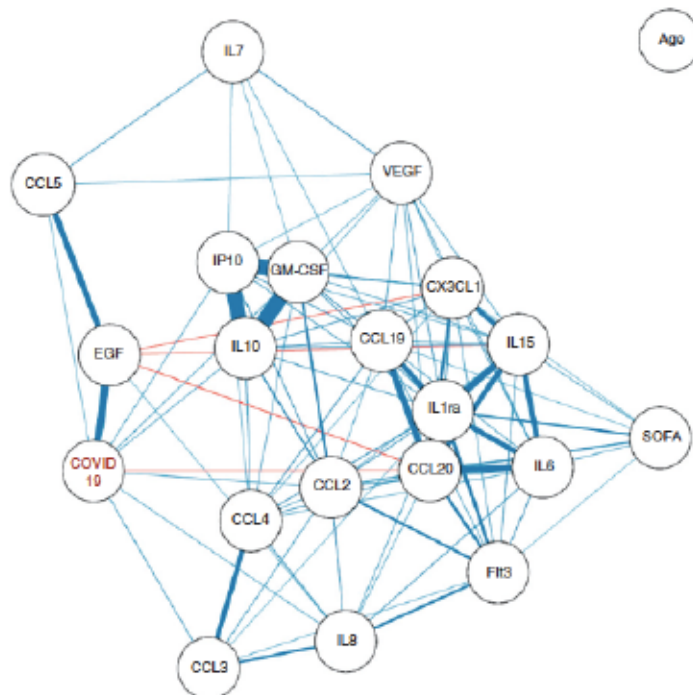


Figure 3. Correlation network between cytokines and coronavirus disease (COVID-19) status. The correlation network is constructed from all pairwise correlations between cytokines and the COVID-19 status, computing Spearman and biserial correlation coefficients for continuous–continuous and binary–continuous variables correlations, respectively. Variables are represented by nodes and connected by edges. Red and blue lines represent negative and positive correlations, respectively, with line width, color saturation, and variable proximity on the graph being proportional to the strength of the correlation. Shown edges are all based on statistically significant correlation coefficients at the $P < 0.05$ level after Benjamini–Hochberg correction for test multiplicity. SOFA = Sequential Organ Failure Assessment.

concentrations of GM-CSF were significantly higher in patients with COVID-19 than in others. The serum concentrations of EGF (epithelial growth factor) were significantly higher in patients with COVID-19 than in others.

To distinguish features between non-COVID-19 bacterial or viral and COVID-19 ARDS, we analyzed cytokines concentrations according to these three categories (Table E3). Interestingly, there were dramatically lower serum concentrations of IL-10, CXCL10/IP-10, and GM-CSF in patients having bacterial/nondocumented ARDS than in patients with non-COVID-19 viral ARDS or COVID-19, suggesting that these are biomarkers of viral infections. In contrast, as compared with patients with COVID-19, those with

bacterial, but also those with viral non-COVID-19 ARDS, tended to exhibit lower concentrations of CCL3/MIP-1a and showed dramatically lower concentrations of EGF. These results suggest that EGF and, to a lesser extent, CCL3/MIP-1a are specific to COVID-19 ARDS.

In all, two main cytokine clusters could be identified, as indicated by the strong correlation coefficients among them (Figures 3 and E5). The first one comprised CXCL10/IP-10, GM-CSF, and IL-10 and was related to COVID-19 ARDS. The second one comprised IL-6, IL-1Ra, CCL20/MIP-3a, CX3CL1, and IL-15 and was linked to SOFA, reflecting associated organ failures. No correlation was observed between serum cytokines concentrations and patients' age.

Immune Dysregulation and Higher Nasopharyngeal Viral Load Are Associated with Day-28 Mortality in Patients with COVID-19

We further analyzed whether serum cytokines concentrations and leukocytes numbers and phenotype were linked to fatal outcome. Serum concentrations of IL-10, CXCL10/IP-10, GM-CSF, and CX3CL1 were significantly higher in patients who had died at ICU Day 28 than in those who were still alive (Tables E4 and E5). In contrast, serum concentrations of EGF were higher in patients who survived. SARS-CoV-2 viral loads, quantified with the cycle threshold of RT-PCR performed on nasopharyngeal swabs, were also higher both upon ICU admission and during the course of ICU stay in patients who were dead at Day 28 (Tables 3 and E4 and Figure 4). After adjustment for age and SOFA, the serum concentrations of CXCL10/IP-10 and GM-CSF as well as SARS-CoV-2 viral loads remained significantly different between patients who died and those who were still alive (Tables 3 and E5). Such results are consistent with the fact that CXCL10/IP-10, GM-CSF, and IL-10 were highly correlated with COVID-19 ARDS but not with age and SOFA (Figures 3 and E5).

Discussion

The main results of the current study, which compared the clinical characteristics and immune response of patients with COVID-19 ARDS with those of patients with non-COVID-19 ARDS, are as follows: 1) patients with COVID-19 ARDS had higher Day-28 mortality, although they had initially less severe ARDS, according to the Berlin definition categorization and Pa_{O_2}/Fi_{O_2} ratio; 2) patients with COVID-19 ARDS displayed a peculiar immune phenotype characterized by profound and sustained lymphopenia with decreased or delayed expression of markers of cellular activation, together with features of monocyte activation; 3) comparing their cytokines/chemokines serum concentrations with those of patients with non-COVID-19 ARDS allowed for identifying a "chemokine signature"; and 4) patients with COVID-19 ARDS who were dead at Day 28 showed increased serum concentrations of IP-10 and GM-CSF

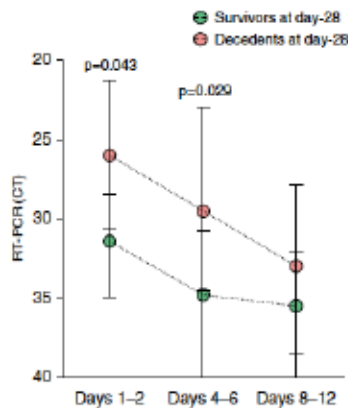


Figure 4. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RT-PCR CT kinetics measured in nasopharyngeal swabs obtained at Days 1–2, Days 4–6, and Days 8–12 of ICU admission in Day-28 survivors (green circles, $n=25$) and decedents (red circles, $n=13$). Note that the y-axis is inverted so as to reflect that the RT-PCR CT is inversely correlated with RNA viral load. By two-way ANOVA with repeated measures, there was a significant effect of time ($P=0.002$) of outcome (survivors vs. decedents, $P=0.0003$) with no significant interaction (time \times outcome, $P=0.831$). P values indicated on the figure come from the Sidak's multiple comparisons test. Circles represent median values, and error bars show the interquartile ranges. CT=cycle threshold.

together with higher nasopharyngeal viral load upon ICU admission.

Although patients with COVID-19 seemed to have less severe ARDS upon ICU admission than their non-COVID-19 counterparts, they eventually displayed dramatically higher Day-28 and ICU mortalities, implying profound differences regarding the mechanisms driving the course of the disease and orchestrating the severity of respiratory and other organ failures. Importantly, patients with previously known immunosuppression were excluded from both groups. The physiological basis for this morbidity is believed to be the selective death of type II pneumocytes following SARS-CoV-2 cell entry and subsequent innate immune response, which results in fluid leakage into the lungs and diffuse alveolar damage (20). After SARS-CoV-2 binds to angiotensin-converting enzyme-2-overexpressing organs, increases in nonspecific inflammation markers are observed. In

more severe cases, a marked systemic release of inflammatory mediators and cytokines occurs, with corresponding worsening of lymphopenia and potential atrophy of lymphoid organs, impairing lymphocyte turnover (21). Our finding of profound/sustained lymphopenia observed in patients with COVID-19 ARDS is consistent with these observations. We also report more pronounced quantitative and qualitative immune cell alterations in patients with COVID-19 than in the subset of those without COVID-19 having viral (non-SARS-CoV-2) ARDS, including lower B-cell counts and frequency of PD-1⁺CD8⁺ lymphocytes, pointing out specific cellular immunity features of SARS-CoV-2 severe infections. In contrast, as recently reported (22, 23), HLA-DR expression on circulating monocytes was relatively conserved in patients with COVID-19 as compared with others, confirming that, as previously shown (24), this biomarker is relevant for bacterial sepsis but likely not for viral sepsis, including that related to SARS-CoV-2.

The identification of immunological biomarkers is a crucial issue in COVID-19 to better understand the pathophysiology of the disease and help clinicians delineate groups of patients with different outcomes. IL-6 and IL-1Ra were reported to be elevated in severe SARS-CoV-2 infection, and serum IL-6 levels have been proposed as a predictor of COVID-19 severity (25–27). Increased serum concentrations of IL-8, IL-10, and GM-CSF have also been associated with disease severity (2, 3). Strikingly, in our study, the serum concentrations of IL-6, IL-1Ra, and IL-8 not only showed no, or only marginally, significant differences between patients with COVID-19 and patients with non-COVID-19 ARDS but also were not associated with Day-28 mortality in the subgroup of patients with COVID-19. As a matter of fact, the serum concentrations of IL-6 and IL-1Ra correlated with the SOFA score, indicating that these cytokines rather behave as biomarkers of organ failure-associated hyperinflammation, consistent with their previously reported association with patient severity and outcome in cohort studies merging patients with mild to severe disease (2, 3, 26, 27), whereas only particularly sick patients were included in the current study. In patients with COVID-19, the time course of some serum biomarkers (i.e., IL-8, CCL20, VEGF) showed an increasing concentration over time, whereas there was

an opposite trend in patients without COVID-19, illustrating a more intense, unresolving, inflammatory response during the early phase of disease, consistent with the prolonged durations of viral shedding (28) and ICU stay (29) reported in these patients. In line with this sustained inflammatory response, the “chemokine signature” (CCL3, CCL4, CCL19, and CLL5) remained stable over time. Nevertheless, the inclusion of a group of patients with non-COVID-19 ARDS in the current study allowed us to identify specific biomarkers of COVID-19 ARDS. Indeed, serum concentrations of EGF were strongly associated with COVID-19 (Figure 2), possibly reflecting the severity of acute lung injury but also SARS-CoV-2-associated injuries in peripheral organs, such as the ileum and the kidneys (30), as observed in patients with COVID-19. Strikingly, serum concentrations of EGF were higher in patients with COVID-19 than in those with non-SARS-CoV-2 viral ARDS, suggesting that EGF could be a relatively specific biomarker of SARS-CoV-2-associated tissue injury, which could be linked to the role of EGF in alveolar injury repair through binding to its receptors, including the human epidermal growth factor receptor family (31). Consistently, COVID-19 survivors exhibited higher serum EGF concentrations than others upon ICU admission. We also identified a group of chemokines/cytokines, including IP-10, IL-10, and GM-CSF, with serum concentrations that were not only highly correlated to COVID-19 but also associated with Day-28 mortality in patients with COVID-19 ARDS. Elevated serum levels of IP-10, IL-10, and GM-CSF have been associated with disease severity in patients with COVID-19 (3, 32). GM-CSF is involved in the production of proinflammatory cytokines and promotes leukocyte chemotaxis, further amplifying the inflammatory process; IP-10, through binding to chemokine receptor 3, activates and recruits leukocytes, including T cells and monocytes, and thus perpetuates inflammation, and IL-10 typically inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and hampers the expression of the major histocompatibility complex and costimulatory molecules (33). Our finding of an IP-10, IL-10, and GM-CSF signature further highlights the contribution of myeloid cells to pathogenic inflammation during SARS-CoV-2 infection. An increased influx of innate immune cells into the lungs may fuel an autoinflammatory loop leading to tissue

Table 3. Variables Associated with Day-28 Mortality in Patients with COVID-19 (n = 38)

Variables	Unadjusted Analysis			Adjusted Analysis*		
	Alive (n = 25)	Dead (n = 13)	P Value	Alive (n = 25)	Dead (n = 13)	P Value
Clinical features (categorical variables)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)		Adjusted Odds Ratios (95% CI)		
Diabetes	4 (16)	8 (61)	0.009	4.10 (0.67–25.00)		
COPD	1 (4)	4 (31)	0.038	1.41 (0.09–21.49)		
Chronic heart failure	1 (4)	5 (38)	0.012	13.12 (0.41–424.00)		
Clinical and general laboratory features (continuous variables)	Mean (±SD)	Mean (±SD)		Adjusted Mean (±SE)	Adjusted Mean (±SE)	
Age, yr	57.04 (±12.43)	68.15 (±10.37)	0.007	56.93 (±2.53)	68.36 (±3.55)	0.017
SOFA	7.0 (±2.8)	9.8 (±2.6)	0.017	7.1 (±0.6)	9.9 (±0.8)	0.013
PaO ₂ /F _i O ₂ ratio, mm Hg	121.2 (±58.6)	361.3 (±761.0)	0.036	128.8 (±101.1)	356.0 (±145.2)	0.243
Creatinine, μmol/L	85.6 (±34.6)	210.4 (±287.4)	0.093	94.6 (±38.3)	191.3 (±55.0)	0.191
Serum cytokine concentrations†						
IL-6, pg/ml (log)	4.9 (±1.0)	5.5 (±0.7)	0.070	5.0 (±0.2)	5.6 (±0.3)	0.168
IL-10, pg/ml	397.1 (±133.1)	503.7 (±116.5)	0.013	400.0 (±29.9)	502.2 (±46.0)	0.093
CXCL10/IP-10, pg/ml	1,563.3 (±878.9)	2,542.2 (±1,025.4)	0.017	1,613.3 (±213.9)	2,487.2 (±329.9)	0.047
GM-CSF, pg/ml	179.1 (±60.6)	232.8 (±52.9)	0.005	179.1 (±13.6)	234.2 (±21.0)	0.050
CCL19/MIP-3b, pg/ml (log)	4.7 (±0.6)	5.2 (±0.9)	0.085	4.8 (±0.1)	5.1 (±0.2)	0.381
CCL20/MIP-3a, pg/ml (log)	2.0 (±0.9)	2.7 (±1.1)	0.076	2.1 (±0.2)	2.4 (±0.3)	0.429
EGF, pg/ml	479.4 (±221.6)	336.6 (±129.0)	0.033	477.6 (±44.4)	363.7 (±68.5)	0.204
CX3CL1/fractalkine, pg/ml (log)	6.8 (±0.4)	7.1 (±0.5)	0.028	6.9 (±0.1)	7.0 (±0.2)	0.384
Other laboratory features						
qRT-PCR viral load‡, cycle threshold	31.68 (±4.70)	25.27 (±5.23)	0.002	31.31 (±1.09)	25.71 (±1.56)	0.010

Definition of abbreviations: CI = confidence interval; COPD = chronic obstructive pulmonary disease; COVID-19 = coronavirus disease; SOFA = Sequential Organ Failure Assessment.

Bold results are statistically significant at the $P < 0.05$ level.

*Results from linear regression modeling adjusting for age and SOFA score.

†Missing data: $n = 3$.

‡Obtained from nasopharyngeal swabs.

damage and respiratory failure (22). Indeed, the study by Liao and colleagues (34) and that of Zhou and colleagues (19) observed an infiltration of inflammatory monocytes with a strong interferon gene signature in the BAL fluid of patients with COVID-19 that likely contribute to the rapid decline in alveolar patency and further amplify acute lung injury. We also found a higher level of IP10, GM-CSF, and IL-10 in non-COVID-19 viral ARDS as compared with their bacterial counterparts, suggesting that these biomarkers are associated with severe viral ARDS.

The SARS-CoV-2 viral load measured in the respiratory tract has previously been shown to be associated with disease severity (28), possibly reflecting an impaired type I IFN response. Our finding that patients with COVID-19 had delayed increase in HLA-DR⁺CD38⁺CD8⁺ T lymphocytes and lower percentages of CD8⁺PD-1⁺ T lymphocytes than patients without

COVID-19 is consistent with the lack of control of viral replication observed in the most severe patients (Figure 4). Indeed, the viral load obtained from nasopharyngeal samples was higher in patients who died than in those who survived, even after adjusting for age and SOFA score. Low CD8⁺ lymphocyte counts were recently shown to be predictors of mortality in patients with COVID-19 (26); more specifically, HLA-DR⁺CD38⁺CD8⁺ T lymphocytes have been shown to have a crucial role in response to viral infections (16, 17), and their increasing percentage over time has been associated with SARS-CoV-2 clearance and patient recovery (35). Yet, we failed to establish a significant relationship between adaptive immunity features (ie, lymphocyte counts and activation status assessed by PD-1 and HLA-DR/CD38 expression) and outcomes of patients with COVID-19. However, consistent with previous findings (5, 33), patients with COVID-19 exhibited a global lymphopenia

together with delayed (HLA-DR/CD38) or impaired (PD-1) activation of CD8⁺ lymphocytes, and higher nasopharyngeal viral loads in patients who were eventually dead at Day 28, suggesting a key role of adaptive immune response impairment in viral immune evasion.

Our study certainly has some limitations. This is a monocenter study, which included a relatively small number of patients, thus limiting the generalizability of the findings and the statistical power to show between-group differences. Indeed, our ability to identify outcome biomarkers was limited, particularly in the non-COVID-19 group owing to the low number of deaths at Day 28 ($n = 4$), and the results of the conducted analyses, some of which would lose statistical significance after accounting for multiple testing, should be considered exploratory and interpreted with caution. Our study only included those patients with the most severe COVID-19

(i.e., those admitted in the ICU for acute respiratory failure), as illustrated by a 52% ICU mortality, restricting our findings to this subset of patients. Yet, we believe our study also has some strengths, including the fact that we compared COVID-19 with non-COVID-19 ARDS together with the fact that we excluded patients with previously known immunosuppression in both groups, allowing us to identify biomarkers specifically associated with SARS-CoV-2 infection. Importantly, although the two groups of patients were managed during different time periods (i.e., between 2014 and 2018 for patients with non-COVID-19 ARDS and March 2020 for patients with

COVID-19), routine management followed national guidelines and, notably, the mechanical ventilation strategy applied and the indications for ARDS adjuvant therapies did not vary significantly over time.

Conclusions

We reported adaptive immune response impairment and a “chemokine signature” in patients with SARS-CoV-2 infection and showed that increased serum concentrations of IP-10 and GM-CSF and higher nasopharyngeal viral loads were associated with outcomes. Such results highlight the contribution of

myeloid cells and impaired adaptive immune response with associated viral immune evasion to pathogenic inflammation during SARS-CoV-2 infection. ■

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

Acknowledgment: The authors thank Franck Delsfond, Nathalie Croener, and Lily Wan for performing flow cytometry analyses; Dr. Jean Hazebrouck for helping collect clinical data; and the nurses of the medical ICU, Henri Mondor Hospital, for their help in processing patients' samples.

References

- 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;180:1–11.
- Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020;71:762–768.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497–506.
- 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;46:846–848.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Ntseas MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, et al. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe* 2020;27:992–1000, e3.
- Lelaman DE, Deutschman CS, Legrand M. Facing COVID-19 in the ICU: vascular dysfunction, thrombosis, and dysregulated inflammation. *Intensive Care Med* 2020;46:1106–1108.
- Remy KE, Brakenridge SC, Franciosi B, Dak T, Deutschman CS, Monneret G, et al. Immunotherapies for COVID-19: lessons learned from sepsis. *Lancet* [online ahead of print] 28 Apr 2020; DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30217-4.
- Franciosi B, Jeannot R, Dak T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, et al. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 2018;3:e96960.
- Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012;307:2526–2533.
- Bendib I, de Cheseaux L, Granger V, Schlemmer F, Maître B, Hüe S, et al. Neutrophil extracellular traps are elevated in patients with pneumonia-related acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 2019;130:581–591.
- Mercat A, Richard J-CM, Vieille B, Jaber S, Osman D, Diehl J-L, et al. Expiratory Pressure (Express) Study Group. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008;299:646–655.
- Papazian L, Aubron C, Brochard L, Chiche J-D, Combes A, Dreyfuss D, et al. Formal guidelines: management of acute respiratory distress syndrome. *Ann Intensive Care* 2019;9:69.
- Damell MER, Taylor DR. Evaluation of inactivation methods for severe acute respiratory syndrome coronavirus in noncellular blood products. *Transfusion* 2006;46:1770–1777.
- Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis* 2020;221:1762–1769.
- Du R-H, Liang L-R, Yang C-Q, Wang W, Cao T-Z, 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;55:2000524.
- McElroy AK, Akondy RS, Davis CW, Elkadeby AH, Mehta AK, Kraft CS, et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:4719–4724.
- Ndhlovu ZM, Kanya P, Mawala N, Klovepris HN, Nkosi T, Pretorius K, et al. Magnitude and kinetics of CD8+ T cell activation during hyperacute HIV infection impact viral set point. *Immunity* 2015;43:591–604.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunction to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013;13:862–874.
- Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, et al. Pathogenic T cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storm in severe COVID-19 patients. *Nat Sci Rev* [online ahead of print] 13 Mar 2020; DOI: 10.1093/nsr/nwaa041.
- Mason RJ. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *Eur Respir J* 2020;55:2000607.
- Terpos E, Ntaniasi-Stathopoulou I, Elalamy I, Kastiris E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol* 2020;95:834–847.
- Jeannot R, Dak T, Formento R, Feuillard J, François B. Severe COVID-19 is associated with deep and sustained multifaceted cellular immunosuppression. *Intensive Care Med* 2020;46:1760–1771.
- Monneret G, Cour M, Viel S, Venet F, Argaud L. Coronavirus disease 2019 as a particular sepsis: a 2-week follow-up of standard immunological parameters in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2020;46:1764–1766.
- Monneret G, Lapape A, Volrin N, Bohé J, Venet F, Debard A-L, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32:1175–1183.
- Wang C, Fei D, Li X, Zhao M, Yu K. IL-6 may be a good biomarker for earlier detection of COVID-19 progression. *Intensive Care Med* 2020; 46:1475–1476.
- Luo M, Liu J, Jiang W, Yue S, Liu H, Wei S. IL-6 and with CD6+ T cell count early predict in-hospital mortality for patients with COVID-19. *JCI Insight* 2020;5:e139024.
- Valle DMD, Kim-schulze S, Hsin-hui H, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature helps predict COVID-19 severity and death [preprint]. *medRxiv*; 2020 Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.28.20115758v1>.
- Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* 2020;369:m1443.
- Grasselli G, Zangrillo A, Zenella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, et al. COVID-19 Lombardy ICU Network. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2

- admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA* 2020;323:1574–1581.
30. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hegde S, Kim J, Kuksin M, et al.; Sinal Immunology Review Project. Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity* 2020;52:910–941.
31. Finigan JH, Downey GP, Kern JA. Human epidermal growth factor receptor signaling in acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;47:395–404.
32. Chi Y, Ge Y, Wu B, Zhang W, Wu T, Wen T, et al. Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China. *J Infect Dis* 2020;222:746–754.
33. Costela-Ruiz VJ, Illescas-Montes R, Puerta-Puerta JM, Ruiz C, Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: the role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev* [online ahead of print] 2 Jun 2020; DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.06.001.
34. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020;26:842–844.
35. Thevarajan I, Nguyen THO, Koutsakos M, Druce J, Caly L, van de Sandt CE, et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat Med* 2020;26:453–455.

III. Discussion

Malgré de nombreuses avancées dans la compréhension de la physiopathologie du SDRA et l'amélioration de sa prise en charge au cours des dernières décennies, des travaux récents ont ouvert la voie à des stratégies de médecine personnalisée. En effet, des sous-groupes de patients SDRA, présentant des endotypes différents, répondent de manière différentielle à des interventions thérapeutiques pharmacologiques [93] ou à des stratégies de management des fluides [38]. L'identification de biomarqueurs a donc toute sa place dans le cadre de la recherche d'endotypes de patients, étape préliminaire à une médecine personnalisée.

L'objectif ambitieux de notre travail était d'identifier des biomarqueurs alvéolaires mais aussi sanguins dans le but de différencier les patients selon leur pronostic clinique et de comprendre les liens entre ces biomarqueurs et les mécanismes physiopathologiques qui gouvernent le SDRA septique. Nous avons pu développer une approche translationnelle originale, en réalisant, d'une part, une cohorte observationnelle longitudinale chez des patients atteints de SDRA septique et, d'autre part, en analysant leurs échantillons biologiques sanguins et alvéolaires à la recherche de biomarqueurs pronostiques. Nos résultats peuvent être résumés ainsi :

1. Valeur pronostique des NETs au cours du SDRA : les NETs étaient élevés dans le sang et dans le LBA et étaient associés aux taux d'IL-8 et de neutrophiles. Cependant, des niveaux plus élevés de NETs n'étaient pas associés à la mortalité ni à la durée de ventilation mécanique.
2. Identification de biomarqueurs alvéolaires biologiques et cellulaires pronostiques dans le SDRA infectieux (hors pneumonie SARS-CoV-2) et étude de leur compartimentalisation alvéole-sang : la quantification de la concentration de 22 biomarqueurs, ainsi que l'évaluation de l'expression cellulaire d'HLA-DR sur les monocytes et de PD-1 sur les lymphocytes TCD8+ alvéolaires et sanguins a permis d'identifier l'IL-8 comme étant la cytokine la plus compartimentalisée et l'IL-1Ra comme la cytokine associée à la mortalité hospitalière après ajustement sur les principales variables confondantes (score SOFA et pression motrice). L'expression d'HLA-DR sur les monocytes et de PD-1 sur les lymphocytes T CD8+ étaient, certes,

compartimentalisées dans l'alvéole, mais n'étaient pas associées à la mortalité hospitalière.

3. Étude de l'activité fonctionnelle des monocytes alvéolaires et circulants : les monocytes alvéolaires présentaient un statut désactivé et une capacité de production de cytokines inflammatoires altérée mais conservaient une activité phagocytaire similaire à celle des monocytes issus des témoins non SDRA. Le niveau d'expression d'HLA-DR sur les monocytes alvéolaires ne semblait pas être un marqueur de substitution de leur activité.
4. Identification de biomarqueurs pronostiques au cours du SDRA COVID-19 : les patients atteints de SDRA COVID-19 avaient un phénotype de réponse immunitaire adaptative altérée avec une lymphopénie profonde et une activation lymphocytaire altérée ou retardée. Ils présentaient une "signature de chimiokines" avec des concentrations sériques accrues d'IP-10 et du facteur de croissance GM-CSF associées à leur pronostic. Ces résultats mettaient en évidence la contribution des cellules myéloïdes et une réponse immunitaire adaptative altérée avec une évasion immunitaire virale associée à l'inflammation pathogénique pendant l'infection par le SARS-CoV-2.

Si l'ensemble de notre travail nous semble représenter une contribution significative dans la quête de biomarqueurs utiles à la compréhension de la physiopathologie et à la prise en charge du SDRA septique, il soulève également de nombreuses questions laissées sans réponses et appelle certains commentaires.

1. Pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) : une épée à double tranchant dans le SDRA septique

L'importance des NETs en tant que composants du système de défense de l'hôte est illustrée dans la maladie granulomateuse chronique, où les patients ne peuvent pas former d'espèces réactives de l'oxygène et sont rendus déficients en NETs [384] entraînant des infections récurrentes menaçantes pour la vie [385]. Déterminer le véritable rôle des NETs (protecteur vs délétère) dans le SDRA reste cependant difficile.

Il a été démontré que plusieurs stimuli infectieux et non infectieux généralement associés au SDRA déclenchent une NETose régionale, notamment des bactéries vivantes, l'exposition au LPS, l'IL-8 ou des espèces réactives de l'oxygène [384]. Dans un modèle expérimental de SDRA lié à la pneumonie grippale, Narasaraju et coll. [142] ont démontré que la production de NETs pulmonaires était induite par le virus de la grippe et corrélée à la gravité des lésions pulmonaires. De même, en utilisant un modèle murin de pneumonie à pneumocoque, Moorthy et coll. [386] ont observé que la génération de NETs était associée à l'épaisseur de la capsule pneumococcique déterminant la sensibilité du *Streptococcus pneumoniae* à la destruction médiée par les neutrophiles, reflétant la gravité de la maladie. En revanche, dans un modèle murin de double agression pulmonaire induite par une exposition à du LPS ou à la ventilation mécanique conduisant à la production de NETs bronchoalvéolaires, le traitement par DNase ne réduisait pas de manière significative les lésions pulmonaires [387]. Ces données suggèrent que la pathogénicité des NETs est équivoque et peut dépendre de la cause des lésions pulmonaires. Dans notre étude, le fait que la concentration de NETs bronchoalvéolaires étaient associée à l'infiltration alvéolaire neutrophilique et à des concentrations élevées d'IL-8 alvéolaire était cohérent avec l'existence d'une NETose régionale [388]. Cependant, dans notre cohorte, les patients atteints de SDRA ayant de fortes concentrations de NETs alvéolaires avaient la même sévérité de la maladie après intubation, mais ils étaient moins hypoxémiques à J1 et avaient une durée totale de ventilation mécanique et de séjour en réanimation plus courte que les patients avec une plus faible concentration de NETs alvéolaires. Nous n'avons néanmoins pas observé d'association significative entre les concentrations de NETs alvéolaires et le nombre de jours vivants sans ventilation mécanique à J28, même après avoir pris en compte les facteurs de

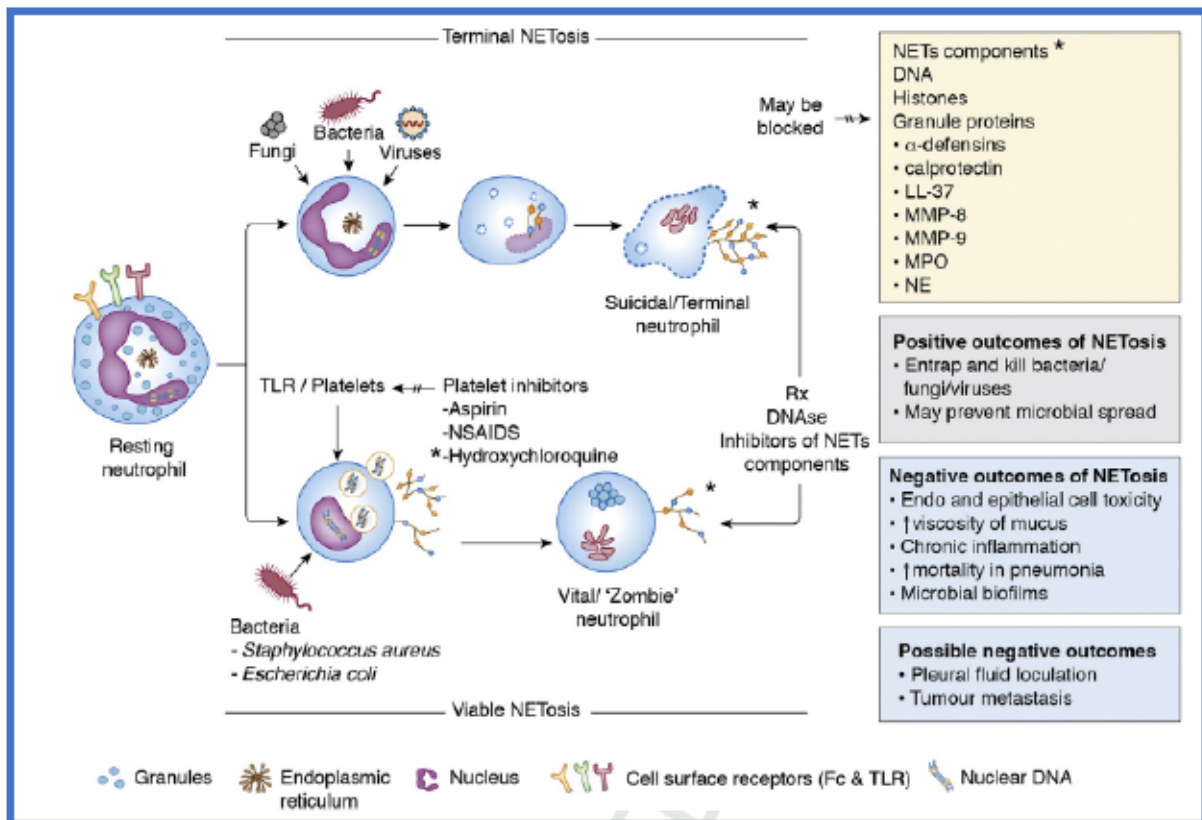
confusion potentiels cliniquement pertinents (rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ et volume courant administré). Il est important de noter que nos résultats ne soutiennent pas l'hypothèse d'un rôle néfaste prédominant des NETs au cours du SDRA, mais suggèrent plutôt qu'ils pourraient être bénéfiques au début du SDRA secondaire à une pneumonie. Un tel effet protecteur, s'il était confirmé par d'autres études, pourrait être cohérent avec les effets antimicrobiens connus des NETs, dont il a déjà été démontré qu'ils piègent et tuent une variété d'agents pathogènes, notamment *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* [128, 389]. D'ailleurs, la dégradation de NETs, en utilisant la DNase chez des souris atteintes de sepsis polymicrobien, entraînait l'augmentation de la charge bactérienne et une aggravation des lésions pulmonaires [378]. En outre, les NETs sont essentiels pour contrôler les infections bactériennes et fongiques, et la NETose semble être étroitement contrôlée plutôt que d'être un événement non spécifique dans la défense de l'hôte [390]. Ainsi, cibler les NETs comme thérapie adjuvante dans les lésions pulmonaires devrait prendre en compte les effets sur la défense de l'hôte contre les infections.

D'un autre côté, certaines données cliniques suggèrent que les NETs contribuent à l'altération de la fonction pulmonaire et à la gravité de la maladie dans la pneumonie communautaire [391] et dans le SDRA [392, 393]. Au cours de la pneumonie sévère et du SDRA septique [391, 392], des concentrations sanguines élevées de NETs étaient associées à un séjour en hospitalisation et une récupération prolongés ainsi qu'à une mortalité accrue. Des niveaux élevés de NETs (MPO) broncho-alvéolaires étaient associés à un pronostic plus sombre, à l'inoculum bactérien et au risque de pneumonie acquise sous ventilation mécanique [393]. Cependant, comme l'illustre notre lettre adressée à Twaddell et coll. [379, 394], qui ont examiné en détail le rôle des NETs dans les maladies respiratoires, les preuves actuellement disponibles soutenant l'hypothèse selon laquelle les effets néfastes des NETs dépasseraient leurs effets protecteurs dans le SDRA clinique, par opposition au SDRA expérimental, sont rares. En effet, les quatre études cliniques publiées à date de publication évaluant la relation entre les niveaux de NETs et le pronostic des patients inclus montrent une grande hétérogénéité concernant: (1) les maladies respiratoires pour lesquelles les patients ont été inclus; (2) les méthodes utilisées pour l'évaluation de la concentration et le type des NETs ciblés (ADN myéloperoxydase, complexes ADN-élastase, ADN acellulaire ou nucléosomes acellulaires); (3) le compartiment (alvéolaire vs sanguin) dans lequel les mesures des NETs ont

été effectuées ; (4) le délai entre l'apparition du SDRA et l'échantillonnage des NETs ; et, enfin (5) les paramètres cliniques pronostiques utilisés : développement d'un SDRA [392], pneumonie acquise sous ventilation mécanique [393], mortalité hospitalière [391] ou nombre de jours sans ventilation mécanique à J28 [388]. Ces données sont très hétérogènes et il est donc difficile de conclure de façon formelle quant à l'effet délétère ou bénéfique des NETS au cours du SDRA.

Les NETs sont à la fois une arme de défense antimicrobienne efficace, mais aussi une sources de molécules ayant des rôles d'effecteur immunitaire et pro-inflammatoires (**Figure 16**) qui, chez les individus sensibles, peuvent favoriser les lésions tissulaires et l'auto-immunité [144, 395–397]. De plus, d'autres granulocytes (monocytes et éosinophiles) peuvent former des pièges extracellulaires lors de la stimulation [398, 399]. Dans le cas des monocytes, des structures de type METs (*monocyte extracellular traps*) contenant de l'ADN mitochondrial et des protéines granulaires ont été proposées pour contribuer à la défense de l'hôte et aux réponses inflammatoires [400].

Figure 16. Mécanismes de formations des pièges extra-cellulaires des neutrophiles (NETs) et leurs potentiels effets. Issue de [379].



La NETose dépend de divers stimuli inflammatoires dans diverses circonstances, notamment la présence de bactéries et de lipopolysaccharides (LPS) dans l'environnement. Les cellules épithéliales peuvent également produire du LL-37 ainsi que de l'IL-8, qui peuvent tous deux déclencher la formation de NET, tout comme des concentrations élevées d'espèces réactives de l'oxygène. Il existe donc des voies par lesquelles la NETose peut être déclenchée par des agents pathogènes, des cellules épithéliales et la formation de NETs elle-même, suggérant une boucle de rétroaction positive. Quelle que soit la voie, la NETose entraîne la libération de chromatine hautement décondensée de l'intérieur des neutrophiles et se distingue de la nécrose et de l'apoptose. Il existe une NETose terminale et une autre voie alternative ou NETose vitale permettant aux neutrophiles d'expulser leur ADN et leurs histones et rester viables, produisant des neutrophiles anucléaires. Non seulement ce processus diffère de la NETose terminale par le sort des neutrophiles, mais il semble être davantage médié par l'exposition microbienne détectée par le LPS et la stimulation du récepteur de type Toll 4. Selon le stimulus, les neutrophiles peuvent devenir soit des neutrophiles suicidaires (terminaux), soit des neutrophiles vitaux « zombies ». MMP : métalloprotéinase matricielle ; MPO : myéloperoxydase ; élastase des neutrophiles ; NETs : pièges extracellulaires des neutrophiles ; AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens ; TLR : Récepteur de type Toll

Dans l'ensemble, cibler la formation de NETs chez les patients atteints de pneumonie sévère et/ou de SDRA peut être une voie thérapeutique prometteuse [401]. Une importante littérature expérimentale s'est maintenant accumulée et suggère l'intérêt potentiel de la modulation des NETs au cours de divers modèles de lésions pulmonaires aiguës [142, 386]. Ainsi, le ciblage de la séquestration des NETs peut être très efficace dans les lésions pulmonaires aiguës liées à la transfusion [10] ou en cas de choc avec une défaillance

microcirculatoire importante, alors qu'il est moins efficace ou même à risque chez les patients atteints de pneumonie ou d'infections fongiques invasives [402]. Bien que nous ayons beaucoup appris sur la biologie des NETs, davantage de données cliniques doivent être accumulées, en utilisant des techniques de quantification des NETs similaires et standardisées, mesurées à la fois dans le sérum et dans le LBA.

2. Identification de biomarqueurs au cours du SDRA infectieux : du pronostic aux endotypes

L'identification de biomarqueurs fiables constitue un domaine de recherche majeur dans le SDRA pour aider à prédire son développement, stratifier la gravité de la maladie selon des endotypes plus précis, fournir de nouvelles informations sur sa pathogenèse et surveiller la réponse au traitement [36]. Nos différents travaux axés sur la recherche de biomarqueurs pronostiques dans le SDRA secondaire à une pneumonie ont été relevés par de nombreuses équipes, en particulier depuis l'apparition de la pandémie COVID-19. A titre d'exemple, notre travail sur la valeur pronostique des NETs [388] a été cité plus d'une cinquantaine de fois et celui explorant l'immunopathologie du SDRA associé à la COVID-19 [403] a été cité plus d'une centaine de fois (d'après *Google Scholar*). Ce référencement de nos travaux témoigne d'un intérêt pour la recherche sur les biomarqueurs, amplifié par la pandémie COVID-19.

2.1.1. Compartimentalisation des biomarqueurs dans le SDRA infectieux

Bien que des améliorations concernant le phénotypage des patients aient été apportées à l'aide d'approches multiparamétriques combinant des variables cliniques et biologiques [37, 38], aucun biomarqueur obtenu à partir d'échantillons sanguins n'a été démontré comme étant systématiquement associé au pronostic du SDRA [48], peut-être en raison d'une compartimentalisation des biomarqueurs au cours du SDRA secondaire à une pneumonie. Le concept de compartimentalisation des cytokines et des cellules immunitaires a été décrit depuis une trentaine d'année, initialement grâce à des modèles animaux de sepsis extra-pulmonaire [367, 404]. Dans le choc septique extra-pulmonaire, le poumon est l'organe le plus

fréquemment défaillant [405]. L'une des caractéristiques du poumon est la présence locale de facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), une cytokine essentielle à la physiologie pulmonaire normale et à la résistance aux infections locales [406]. Cependant, le rôle critique du GM-CSF dans l'homéostasie pulmonaire pourrait bien être un inconvénient dans le cas de l'inflammation pulmonaire induite par l'endotoxine. La synergie entre la signalisation induite par le GM-CSF et le LPS est bien reconnue et, fait intéressant, la neutralisation du GM-CSF supprime l'inflammation pulmonaire induite par le LPS [407].

Pour cette raison, nous nous sommes focalisés sur la valeur pronostique potentielle de biomarqueurs alvéolaires. Pour ce faire, des biomarqueurs précédemment associés à des voies clés impliquées dans la physiopathologie du SDRA [36, 48] ont été quantifiés dans des échantillons de LBA et de sérum obtenus en moyenne un jour après l'intubation et comparés à ceux de patients témoins. Les concentrations alvéolaires de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6, l'IL-8 et l'IP-10/CXCL10, et d'un biomarqueur d'agression épithéliale alvéolaire, la protéine D du surfactant (SP-D), étaient significativement supérieures à leurs concentrations sériques, en faveur d'une production d'origine alvéolaire, dont la plus compartimentalisée était l'IL-8, un puissant chimioattractant des neutrophiles, confirmant son rôle central dans la physiopathologie du SDRA [35, 36]. Et pour cause, l'IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle central dans la régulation de la chimiotaxie des neutrophiles et des monocytes dans les poumons [408]. Des niveaux plasmatiques plus élevés d'IL-8 ont été observés chez des patients non survivants atteints de SDRA [22, 348] et ont été associés à une diminution du nombre de jours sans ventilation mécanique et sans défaillance d'organes [22]. Dans une autre étude, l'association entre le niveau plasmatique d'IL-8 dès J1 chez les patients atteints de SDRA et l'apparition d'un syndrome de défaillance multi-viscérale a été observée, mais sans association avec la mortalité [349]. Dans notre étude, ni la concentration d'IL-8 (alvéolaire ou plasmatique), ni son ratio LBA/sérum n'étaient prédictifs de la mortalité. Cela a été confirmé par deux larges méta-analyses qui ne retiennent pas l'IL-8 comme biomarqueur diagnostique ou pronostique dans le SDRA [48, 409]. Cependant, très peu de données pronostiques concernent l'IL-8 alvéolaire, compartiment difficile d'accès en pratique courante. Il serait intéressant d'étudier la valeur pronostique de l'IL-8 dans le LBA de patient atteints de SDRA septique dans de plus large cohortes.

En complément à notre travail, Jouan et coll. ont évalué les médiateurs inflammatoires dans le compartiment sanguin et dans les aspirations endotrachéales (ETA) de 21 patients COVID-19 atteints de SDRA sévère [369]. Conformément à nos résultats chez les patients atteints de SDRA non COVID-19 [380], ils ont observé une augmentation du ratio de concentration ETA/sang pour l'IL-8, la cytokine dont la concentration était la plus compartimentalisée dans le poumon. De plus, les ratios ETA/sang d'IL-1Ra, d'IL-6, d'IFN- γ , de TNF et d'IP10/CXL10 étaient également très élevés dans le SDRA des patients sans état de choc septique [410]. Les auteurs ont souligné certaines différences concernant l'ampleur du gradient de concentration qu'ils ont mesuré (valeur médiane du ratio ETA/serum d'IL-8 : 7355) et le nôtre, qui n'incluait que des patients non COVID-19 atteints de SDRA associé à une pneumonie (valeur médiane du ratio LBA /serum d'IL-8 : 21). Une telle différence d'amplitude pourrait être due aux facteurs suivants : (1) une dilution des échantillons de LBA ; (2) des différences dans les concentrations d'IL-8 dans les voies respiratoires proximales par rapport aux voies respiratoires distales et, hypothétiquement, (3) les ratios de concentration pulmonaire/sanguine d'IL-8 plus élevés chez les patients COVID-19 que chez les patients non COVID-19 [411]. Cependant, les implications cliniques de ces résultats méritent d'être explorées. D'autres études seront nécessaires pour évaluer si la mesure des ratios de biomarqueurs sélectionnés des concentrations pulmonaires sur sanguines pourrait aider à cibler les patients les plus susceptibles de bénéficier de traitements immunomodulateurs ciblant les voies de ces cytokines [412]. Ainsi, au cours du SDRA lié à la COVID-19, l'inflammation apparaît fortement compartimentalisée dans les poumons. Par conséquent, dans la quête d'identification de biomarqueurs fiables dans le SDRA induit par la pneumonie, notamment par la maladie COVID-19, l'étude du compartiment alvéolaire devrait être prioritaire.

2.1.2. Biomarqueurs solubles

Dans notre étude, au contraire des patients sans état de choc septique, les patients atteints de SDRA lié à une pneumonie en état de choc septique présentaient des ratios de concentrations LBA/sérum plus faibles pour certaines cytokines pro- et anti-inflammatoires : IL-6, IP-10/CXCL10, IL1-Ra, et IL-10. De plus, des valeurs plus faibles du ratio LBA/sérum d'IL-1Ra étaient associées à la mortalité hospitalière, même après ajustement sur le score SOFA et

la pression motrice. Ceci suggérait qu'une moindre compartimentalisation pulmonaire de ces médiateurs pourrait être un mécanisme conduisant à des défaillances d'organes extra-pulmonaires compliquant l'évolution du SDRA, comme précédemment supposé [22].

Les meilleurs panels de prédicteurs de mortalité en soins intensifs pour les patients sous ventilation mécanique atteints de SDRA et pour ceux atteints de sepsis d'origine pulmonaire, comprenaient le score APACHE II comme variable clinique et le biomarqueur plasmatique IL-1Ra [413]. Plusieurs biomarqueurs ont été étudiés pour prédire la mortalité associée au SDRA, mais aucun n'est largement utilisé dans la pratique clinique en raison du manque de reproductibilité de la plupart d'entre eux [48, 409]. Des panels de biomarqueurs ont également été étudiés, avec des performances améliorées lorsqu'ils sont combinés avec des marqueurs cliniques [35, 414, 415]. Cependant, l'IL-1Ra, une cytokine anti-inflammatoire libérée lors de réponses inflammatoires aiguës, n'a pas été incluse dans ces études. Une étude récente a identifié un panel de 6 biomarqueurs prédisant la mortalité dans le SDRA, incluant l'IL-1Ra [416]. Dans toutes ces études, la valeur de l'IL-1Ra comme biomarqueur pronostique ou prédictif de l'apparition du SDRA n'a été étudiée que dans la circulation sanguine et pas dans le compartiment alvéolaire.

Nous avons aussi effectué une analyse exploratoire évaluant la valeur pronostique du ratio LBA/sérum de la concentration de RAGE. Nous avons observé une association significative entre le ratio LBA/sérum de la concentration de RAGE avec la mortalité hospitalière du SDRA infectieux. En revanche, après ajustement sur le score SOFA à l'admission et la pression motrice, cette association n'était plus observée. RAGE est un biomarqueur des lésions de l'épithélium alvéolaire. Ce récepteur est fortement exprimé dans les cellules alvéolaires de type I [417]. Son activation module la signalisation cellulaire et la propagation de la réponse inflammatoire [49]. Calfee et coll. [418] ont rapporté une augmentation des taux plasmatiques de RAGE chez les patients atteints de SDRA sévère, ainsi qu'une corrélation avec la mortalité chez les patients atteints de SDRA ventilés avec un volume courant élevé. Des études ultérieures ont mis en évidence une association entre sRAGE (RAGE soluble, isoforme de la protéine RAGE dépourvue du domaine complet de signalisation du récepteur) avec la gravité [419] et le pronostic de la maladie [420] chez les patients atteints de SDRA. sRAGE a été identifié comme un biomarqueur prometteur du SDRA dans plusieurs méta-analyses [48, 421]. Des concentrations plasmatiques élevées d'Ang-2 et de sRAGE étaient positivement

associées à un risque accru de développement du SDRA, même après ajustement multivarié, dans une revue systématique de 35 études portant sur 10 667 patients à risque de SDRA [48]. Plus récemment, une autre revue systématique des méthodes de diagnostic du SDRA a révélé que le plasma CC-16 et le sRAGE avaient une bonne précision diagnostique dans des études à faible biais comparant des patients atteints de SDRA à une population non sélectionnée de patients gravement malades [421]. sRAGE a été identifié comme un intermédiaire causal potentiel conférant un risque de SDRA associé au sepsis dans une étude de randomisation mendélienne [422]. Cela pourrait impliquer que sRAGE soit non seulement un biomarqueur du SDRA, mais que chez des patients spécifiques, les lésions pulmonaires pourraient être provoquées par sRAGE lui-même. Plusieurs études analysant des panels de biomarqueurs ont désigné RAGE comme un candidat potentiel pour le diagnostic du SDRA [423, 424].

Étant donné qu'aucun biomarqueur biologique sérique spécifique n'a été décrit pour prédire le pronostic du SDRA, plusieurs études réalisées par un même groupe [35, 414, 423, 424] ont examiné une combinaison de biomarqueurs sériques de lésions pulmonaires endothéliales et épithéliales, d'inflammation et de coagulation chez des patients atteints de SDRA issus de plusieurs essais. Dans une première étude chez des patients traumatisés, Fremont et coll. [423] ont démontré qu'une combinaison de biomarqueurs et de signes cliniques était plus efficace pour prédire la mortalité ou stratifier les patients atteints de SDRA que les prédictors cliniques ou les biomarqueurs seuls. Cependant, la sensibilité et la spécificité étaient faibles. Dans leur modèle, RAGE, Angiopétine-2, SP-D et l'IL-8 faisaient partie des biomarqueurs sélectionnés. Dans ce contexte, la capacité à stratifier les patients atteints de SDRA par physiopathologie et probabilité de réponse au traitement enrichirait considérablement les futurs essais cliniques et améliorerait la capacité à détecter un effet bénéfique du traitement proposé. Le sous-phénotypage/endotypage a été réalisé avec succès dans les maladies des voies respiratoires telles que l'asthme et la BPCO avec des implications thérapeutiques importantes [425, 426] et peut même être observé dans le cadre du sepsis sévère [427]. Cependant, il y a peu de données élucidant les sous-phénotypes/endotypes du SDRA. Plusieurs études récentes dont celles utilisant deux cohortes ARDSnet [37, 38], ont identifié deux sous-phénotypes de SDRA qui différaient nettement dans l'histoire naturelle, les caractéristiques cliniques et biologiques, les profils de biomarqueurs, la réponse à la pression positive en fin d'expiration (PEP), le nombre de jours sans défaillance d'organe et

sans ventilation mécanique ainsi que la mortalité [37, 38, 93, 95, 428]. Le sous-phénotype « SDRA hyperinflammatoire » était caractérisé par une prévalence plus élevée de choc septique, des taux plasmatiques élevés de biomarqueurs inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF récepteur 1, protéine C), une plus grande utilisation de vasopresseurs, une mortalité plus élevée et un moindre bénéfice à des interventions sur le ventilateur par rapport au phénotype « faiblement inflammatoire » [37, 38, 93, 95, 428]. En revanche, le sous-phénotype « SDRA faiblement inflammatoire » présentait une inflammation et un choc septique moins sévères. Il est important de noter qu'aucune variable clinique ou biologique à elle seule n'était suffisante pour identifier les sous-phénotypes, ce qui suggère que l'appartenance au phénotype n'était pas simplement le reflet de la gravité de la maladie telle que mesurée par les indices de gravité traditionnels [37]. Dans ce contexte, Bim et coll. [416] ont utilisé des approches analytiques complémentaires pour identifier un panel de six biomarqueurs (Ang-2-angiopoëtine 2-, MIF-*macrophage inhibitor factor*-, IL-8, IL-1Ra, IL-6, eNAMPT-*extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase*-) prometteurs pour prédire la survie dans le SDRA. Ces biomarqueurs fournissent une importante preuve de concept qu'une combinaison de biomarqueurs du SDRA peut améliorer le sous-phénotypage et améliorer la capacité prédictive pronostique au moment du diagnostic. Ces informations pourraient être utiles pour orienter le recrutement dans les essais cliniques et représentent une étape importante vers une meilleure stratification des patients au moment de la prise en charge afin d'améliorer la probabilité d'un essai clinique positif dans cette pathologie.

2.1.3. Biomarqueurs cellulaires et étude fonctionnelle des monocytes alvéolaires

Il existe un consensus actuel pour considérer la diminution persistante de l'expression d'HLA-DR par le monocyte circulant comme un marqueur de l'immunosuppression induite par le sepsis [216, 283, 429]. Dans des études cliniques, il a été démontré que la profondeur et la persistance dans le temps de la diminution de l'expression monocyttaire d'HLA-DR sont associées à une augmentation de la mortalité et du risque d'infection nosocomiale, même après analyse multivariée [216, 430]. Force est de constater qu'au-delà du sepsis, l'expression d'HLA-DR monocyttaire est progressivement devenue un outil d'immunomonitoring dans d'autres contextes de soins intensifs (traumatologie, brûlures, chirurgie) et dans d'autres

domaines cliniques (gastro-entérologie, oncologie, hématologie, transplantation), où elle identifie également les patients à risque d'aggravation : mortalité, infections secondaires, risque de rechute du cancer [430, 431]. Ainsi, l'expression d'HLA-DR par le monocyte circulant, mais aussi alvéolaire, semblait une piste intéressante pour prédire le pronostic des patients ayant un SDRA infectieux.

Nous avons observé que l'expression d'HLA-DR par les monocytes alvéolaires des patients atteints de SDRA secondaire à une pneumonie était inférieure à celle des patients témoins, suggérant une diminution de l'expression d'HLA-DR dans les poumons infectés [380]. Une telle découverte est cohérente avec la diminution de l'expression d'HLA-DR précédemment rapportée sur les monocytes circulants de patients en choc septique [432]. Cependant, nous n'avons pas observé d'association significative entre l'expression d'HLA-DR sur les monocytes alvéolaires et la mortalité hospitalière. La diminution de l'expression d'HLA-DR sur les monocytes circulants peut être restaurée par immunostimulation par du GM-CSF [327], mais peu d'études se sont concentrées sur l'impact pronostique de la diminution de l'expression d'HLA-DR monocyttaire alvéolaire dans ce contexte. Dans le cadre d'une intervention compassionnelle, et faisant l'hypothèse que la restauration de l'expression d'HLA-DR par les monocytes alvéolaires améliorerait le pronostic, Herold et coll. ont administré du GM-CSF inhalé à six patients atteints de SDRA lié à une pneumonie qui présentaient une diminution documentée de l'expression d'HLA-DR par les monocytes alvéolaires [433]. Dans cette étude pilote, l'administration de GM-CSF inhalé a été associée à une meilleure oxygénation et à la restauration de l'expression d'HLA-DR par les monocytes alvéolaires, mais l'absence de groupe témoin et le faible nombre de patients traités ont empêché de tirer toute conclusion ferme de cette intervention. Nos données montrent que *l'immunomonitoring* de l'expression d'HLA-DR par les monocytes alvéolaires au cours des 48 premières heures du SDRA lié à la pneumonie n'a pas permis d'identifier un sous-groupe de patients à risque plus élevé de mortalité, suggérant ainsi que ce biomarqueur ne devrait pas être utilisé, du moins pendant la phase précoce du SDRA, pour surveiller l'état immunitaire régional ou guider des interventions thérapeutiques.

Dans le sepsis, la diminution de l'expression d'HLA-DR par le monocyte circulant illustre cliniquement le phénomène de tolérance aux endotoxines caractérisé par une altération de sa fonction [241, 242]. Comme nous avons précédemment démontré que le niveau

d'expression d'HLA-DR monocytaire alvéolaire n'était pas un biomarqueur pronostique du SDRA secondaire à une pneumonie, cela suggère que, dans le contexte d'une infection pulmonaire sévère, la fonction des monocytes alvéolaires pourrait être plus informative que leur phénotype sur le plan pronostique. Le travail suivant [434] a ainsi consisté à explorer les deux fonctions principales du monocyte alvéolaire : la phagocytose et la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF) suite à une stimulation par du LPS, ainsi que leur lien avec le niveau d'expression d'HLA-DR. L'activité phagocytaire des monocytes alvéolaires n'était pas différente entre les patients atteints de SDRA et les patients non-SDRA, contrastant avec leur diminution d'expression d'HLA-DR qui reflétait une altération de la capacité de présentation d'antigène [241]. Un tel modèle de monocyte a été décrit chez les monocytes alvéolaires issus de patients atteints de mucoviscidose qui présentaient une activité phagocytaire accrue sans pouvoir induire de réponse pro-inflammatoire [435]. Malgré une compartimentalisation de l'expression d'HLA-DR par les monocytes (alvéolaires vs circulants) issus des patients SDRA observée durant nos différents travaux, nous n'avons pas observé de différence de capacité de phagocytose entre les monocytes alvéolaires et les monocytes circulants.

Les monocytes alvéolaires et circulants des patients atteints de SDRA secondaire à une pneumonie étaient hypo-réactifs à la stimulation *ex vivo* par du LPS. De nombreuses études ont déjà rapporté la capacité altérée des monocytes circulants de patients septiques à libérer des cytokines pro-inflammatoires en réponse à une stimulation par du LPS, par des agonistes de TLR ou des bactéries *in vitro* [241, 245, 275]. Fumeaux et coll. ont également observé que les monocytes circulants septiques étaient caractérisés par un rapport intracellulaire IL-10/TNF altéré [294]. En parallèle, grâce à une analyse transcriptomique, les monocytes circulants issus de patients confrontés à des infections à gram négatif puis stimulés par du LPS *ex vivo* ont permis de retrouver un profil de tolérance aux endotoxines tout en améliorant l'activité antimicrobienne et la réparation des tissus [243]. Dans notre étude [434], les monocytes alvéolaires et sanguins de patients atteints de SDRA secondaire à une pneumonie présentaient un comportement caractéristique d'hypo-production de cytokines inflammatoires tout en présentant des fonctions de phagocytose préservées, compatibles avec un phénotype «reprogrammé» plutôt qu'«épuisé». Cette modulation représente un état dans lequel l'hôte tente de contrôler la réponse inflammatoire systémique initiale tout en maintenant le contrôle de l'infection.

En d'autres termes, bien que l'expression d'HLA-DR par le monocyte circulant soit le reflet de l'immunosuppression induite par le sepsis et soit devenue sans conteste un biomarqueur robuste pour la prédiction du pronostic, notamment chez les patients atteints de choc septique, l'expression d'HLA-DR par le monocyte alvéolaire dans le cadre du SDRA infectieux ne semble être ni un biomarqueur pronostique lorsque mesurée précocement - c'est-à-dire dans les 24 heures suivant l'intubation - ni le reflet de la fonction du monocyte alvéolaire.

La voie PD-1/PD-L1 soulève un intérêt grandissant dans le sepsis et dans le SDRA infectieux. La surexpression de PD-L1 par les monocytes circulants est associée à l'altération de leur fonction [215] et est indépendamment associée à la mortalité à J28 chez les patients en choc septique [289]. Morrelli et coll. ont rapporté que l'expression des gènes associés à la voie PD-L1/PD-1 était significativement diminuée dans les macrophages alvéolaires de patients atteints de SDRA décédés ou sous ventilation mécanique prolongée [436]. Plus récemment, Monaghan et coll., ont rapporté l'intérêt du PD-1 soluble comme biomarqueur potentiel dans le SDRA extra-pulmonaire humain et expérimental [437]. Ces résultats suggèrent que l'axe PD-1/PD-L1 est impliqué dans le développement du SDRA [438]. Dans notre travail [434], nous avons observé une expression plus élevée de PD-L1 par les monocytes alvéolaires comparativement aux monocytes sanguins chez les patients atteints de SDRA et non SDRA, avec de possibles effets inhibiteurs sur l'activation des lymphocytes T [439]. Dans ce contexte, nous avons également quantifié l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8+ alvéolaires et sanguins. Les patients atteints de SDRA secondaire à une pneumonie présentaient une expression de PD-1 significativement plus élevée sur les lymphocytes TCD8+ circulants alvéolaires et périphériques que les patients non-SDRA [380]. Ces données sont cohérentes avec les travaux de Zhang et coll. [440] rapportant une expression de PD-1 plus élevée sur les lymphocytes T périphériques des patients en choc septique que sur ceux des témoins. Plusieurs études ont rapporté que les patients présentant un choc septique et des niveaux élevés d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T périphériques étaient plus susceptibles d'avoir une mortalité accrue et une plus grande fréquence d'infections nosocomiales [287, 319, 441]. Cependant, nous n'avons observé aucune association significative entre le niveau d'expression de PD-1 sur les lymphocytes TCD8+ alvéolaires et le pronostic. De plus, les patients atteints de SDRA secondaire à une pneumonie présentaient

une expression de PD-1 significativement plus élevée sur les lymphocytes alvéolaires que sur les lymphocytes TCD8+ sanguins. Une telle compartimentalisation de l'expression de PD-1 a déjà été observée dans des études expérimentales précliniques ainsi que dans des études autopsiques et pourrait simplement refléter le recrutement de lymphocytes activés au site de l'infection [234, 442].

La voie PD-1/PD-L1 pourrait être utilisée comme cible thérapeutique dans ce contexte. Il existe des données expérimentales et cliniques à ce sujet dans le cadre du sepsis sévère. En effet, les anticorps anti-PD-L1 ont montré des bénéfices dans des modèles animaux de sepsis et sont actuellement testés dans des essais cliniques sur le sepsis [335, 443]. Deux études récentes ont démontré que le traitement *ex vivo* avec un anticorps anti-PD-L1 inverse le dysfonctionnement des cellules T induit par un sepsis et améliore la fonction phagocytaire de neutrophiles et de monocytes obtenues à partir de patients septiques [215, 333]. Fait intéressant, une étude récente de Phares et coll. a montré que le blocage de la signalisation PD-1 améliore la capacité phagocytaire des macrophages, la fonction des cellules T et la survie dans un modèle de ligature ponction caecale [444]. Ensemble, ces études suggèrent que le ciblage de l'axe PD-1/PD-L1 est potentiellement intéressant chez les patients septiques.

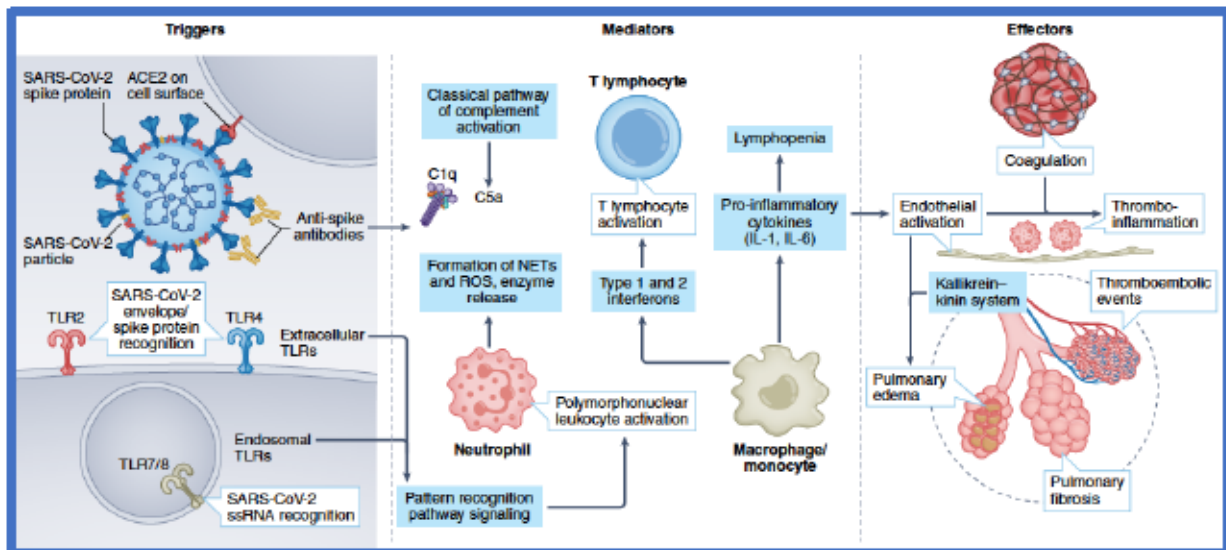
Il existe en revanche peu de données concernant la modulation de la voie PD-1/PD-L1 dans le SDRA infectieux. Nos données n'ont montré aucune différence significative dans les niveaux d'expression de PD-L1 par les monocytes alvéolaires des patients atteints de SDRA et les non-SDRA, suggérant que d'autres études sont nécessaires pour mieux délimiter l'implication de l'axe PD-1/PD-L1 dans le compartiment alvéolaire à la phase aiguë du SDRA.

2.1.4. Immunopathologie du SDRA COVID-19 versus non Covid-19

La COVID-19 est une maladie complexe dans laquelle les manifestations respiratoires associées à la réplication virale s'accompagnent d'effets systémiques, indiquant que l'infection par le SARS-CoV-2 est susceptible de générer une réponse immunitaire largement dérégulée. Dans la physiopathologie de la COVID-19 sévère, nous pouvons identifier les déclencheurs de la maladie, les médiateurs et les voies effectrices (**Figure 17**). Bien que le déclencheur de la maladie soit l'infection par le SARS-CoV-2 et que les premières étapes de l'infection soient relativement similaires chez la plupart des patients, l'hétérogénéité de la physiopathologie de

la COVID-19 augmente avec la gravité de la maladie et est largement déterminée par la variabilité de la réponse immunitaire de l'hôte.

Figure 17. Facteurs immunopathologiques impliqués dans le SDRA COVID-19. Issue de [445].



Un résumé des facteurs physiopathologiques ciblés par les thérapies immunitaires dans le COVID-19, qui peuvent être classés comme déclencheurs de l'infection (par exemple, le virus SARS-CoV-2 et les récepteurs de reconnaissance), médiateurs de la réponse immunitaire (comme les cytokines et le complément) et les mécanismes effecteurs immunitaires (le système kallikréine-kinine et la thrombo-inflammation). ACE2, enzyme de conversion de l'angiotensine 2 ; IL-1/6, interleukine 1/6; NETs, pièges extracellulaire des neutrophiles ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; ssRNA, ARN simple brin ; TLR, récepteurs de type Toll.

Dans notre étude [403], nous avons rapporté des altérations quantitatives et qualitatives plus prononcées des cellules immunitaires chez les patients atteints de SDRA COVID-19 que chez ceux atteints de SDRA non COVID-19, y compris un nombre de cellules B et de lymphocytes T CD8+ PD-1+ plus faible, soulignant les caractéristiques spécifiques de l'immunité cellulaire des infections sévères par le SARS-CoV-2. D'autres études ont non seulement retrouvé une lymphopénie T CD4+, T CD8+ et B marquée [446], mais aussi une association avec la gravité de la maladie et un mauvais pronostic [447]. En plus de cette lymphopénie, la fonction et la capacité des lymphocytes à libérer des interférons de type II sont également gravement affectées chez les patients atteints de COVID-19 sévère [448–451].

Dans notre travail, en raison des précautions sanitaires préconisées lors de la première vague de COVID-19, nous n'avons pas été en mesure d'effectuer des prélèvements broncho-alvéolaires. Il s'avère qu'une compartimentalisation claire de la population pulmonaire de lymphocytes T a été rapportée, avec un schéma particulier de sous-population leucocytaire : des cellules T CD4+ et T CD8+ épuisées, une fraction plus élevée de cellules Treg dans le LBA et une prédominance de neutrophiles, de monocytes et de macrophages caractérisés par une

surexpression des biomarqueurs activateurs de surface (CD64, CD16, HLA-DR, CD11b et CD69) [370].

L'inclusion d'un groupe de patients atteints de SDRA non COVID-19 dans notre étude nous a permis d'identifier des biomarqueurs spécifiques du SDRA COVID-19. Les concentrations sériques d'EGF étaient plus élevées chez les patients atteints de COVID-19 que chez ceux atteints de SDRA non COVID-19, reflétant les lésions tissulaires associées à l'infection sévère par le SARS-CoV-2, possiblement en rapport avec son rôle dans la réparation des lésions alvéolaires [452]. Nous avons également identifié un groupe de chimiokines/cytokines, comprenant IP10, IL-10 et GM-CSF, dont les concentrations sériques étaient non seulement fortement inter-corrélées mais également associées au SDRA COVID-19 (vs non COVID-19), et à la mortalité à J28. Plusieurs études ont également retrouvé que des taux sériques élevés d'IP-10, d'IL-10 et de GM-CSF étaient associés à la gravité de la maladie chez les patients atteints de COVID-19 [453–456]. Notre découverte d'une signature IP-10, IL10 et GM-CSF met en évidence la contribution des cellules myéloïdes à l'inflammation pathogène lors de l'infection sévère à SARS-CoV-2. À l'aide d'une cytométrie spectrale monocellulaire longitudinale de haute dimension et d'une comparaison guidée par algorithme comparant des patients SDRA COVID-19 à des patients atteints de pneumonie non SARS-CoV-2, Kreutmair et coll. ont identifié les sources cellulaires de GM-CSF comme étant principalement les lymphocytes T CD4+ et T CD8+, et observé une corrélation entre son expression et la gravité de la maladie COVID-19 [450]. Collectivement, ces données suggèrent que le GM-CSF est un moteur précoce de la cascade immunopathologique sous-jacente à la COVID-19 sévère, constituant ainsi une cible thérapeutique prometteuse (ClinicalTrials.gov identifiers NCT04400929 and NCT04411680) [457, 458]. L'IP-10, chimiokine exprimée rapidement et de manière transitoire après la vaccination et d'autres infections virales [459–461], était presque invariablement augmentée dans la COVID-19 et était liée à la gravité de la maladie, mais n'était manifestement pas augmentée dans les infections virales respiratoires non COVID-19 [448]. Ainsi, de nombreux patients atteints d'infections respiratoires COVID-19, mais pas d'infection virale respiratoire non COVID-19, ont été décrits par une triade liée à la gravité d'IP-10, d'IL-6 et d'IL-10 plasmatique [448]. De nombreuses études récentes retrouvent un lien indéniable entre la gravité du SDRA COVID-19 et l'augmentation

plasmatique d'IP-10 [456, 462] ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle dans le SDRA COVID-19.

Nous avons observé que l'expression d'HLA-DR sur les monocytes circulants était relativement conservée chez les patients atteints de COVID-19 par rapport aux patients atteints de SDRA bactérien. Quel que soit le protocole utilisé, plusieurs études publiées depuis ont systématiquement signalé une diminution de l'expression d'HLA-DR sur les monocytes circulants des patients COVID-19 [274, 448, 463, 464]. C'était le phénotype le plus manifeste. Des études ont également observé de manière homogène que la profondeur de cette diminution était associée à la gravité. La gravité était également associée à l'épuisement du sous-ensemble de monocytes non classiques (CD14^{low} CD16⁺) [274, 464]. De plus, les monocytes présentaient une altération de la production de cytokines inflammatoires dans des tests fonctionnels [274, 463] indiquant un statut désactivé plutôt que pro-inflammatoire, ce qui est conforme à celui observé par Laing et coll. [448] qui ont mesuré les cytokines circulantes et ont signalé l'absence de large tempête cytokinique. En conséquence, l'hypothèse d'une origine pulmonaire des cytokines circulantes, plutôt que d'une production systémique exacerbée, est plus probable [463]. Cela concorde avec une diminution de l'expression d'HLA-DR sur les monocytes circulants puisque, en cas d'activation massive des monocytes, l'expression d'HLA-DR devrait atteindre des niveaux très élevés. Cependant, les valeurs initiales d'HLA-DR monocyttaire pour les patients SDRA COVID-19 étaient moins faibles que celles retrouvées dans le choc septique [465, 466], ce qui concorde avec nos résultats.

L'analyse histopathologique des poumons COVID-19 révèle un remodelage anormal de la matrice extracellulaire, une prolifération des cellules épithéliales et la présence de NETs [467]. Comme pour les patients SDRA non-COVID-19 [393], chez les patients atteints de SDRA COVID-19, les NETs bronchoalvéolaires sont associées à une augmentation du nombre de neutrophiles et à la concentration d'IL-8 [468]. Plusieurs autres études ont également démontré la présence de NETs dans les poumons de patients décédés de la COVID-19 (Barnes et al., 2020 ; Radermecker et al., 2020) et la contribution potentielle de la formation des NETs dans la réaction inflammatoire et l'immunopathologie du SDRA COVID-19 et. De plus, chez les patients COVID-19 sévères, les neutrophiles immatures prédominent avec une plus grande propension à libérer des NETs, liées à la gravité de la maladie COVID-19, ce qui pourrait expliquer la propension à une progression vers un SDRA (Adrover et al., 2020). L'accumulation

de NETs est également associée à la thrombose microvasculaire pulmonaire pouvant être responsable de la défaillance respiratoire liée à la maladie (Dolhnikoff et al., 2020 ; Leppkes et al., 2020).

Dans l'ensemble, la physiopathologie de la COVID-19 est complexe, comprenant une interaction entre hyperinflammation, déficit de l'immunité adaptative, dysfonctionnement endothélial, complications thromboemboliques et processus fibrotique. Ces processus sont très variables d'un patient à l'autre, probablement liés à l'hétérogénéité de la réponse immunitaire de l'hôte. Des endotypes ont été décrits chez les patients COVID-19, par analogie aux travaux réalisés dans le SDRA non COVID-19, et ont permis de décrire différents sous-phénotypes [469], dont un endotype « hyperinflammatoire », associé à une meilleure réponse à la dexaméthasone [470]. De telles analyses, basées sur des profils de biomarqueurs et de variables cliniques, pourraient permettre d'envisager des approches thérapeutiques ciblées chez les patients atteints de SDRA COVID-19 [471].

3. Limites et perspectives

3.1.Limites

Notre travail, basé sur des études monocentriques, incluant un nombre relativement restreint de patients, a une validité externe limitée. Notre capacité à identifier des biomarqueurs pronostiques était limitée par la puissance statistique de nos études, en particulier liée au faible nombre de décès à J28. Nous n'avons inclus que les patients atteints de SDRA les plus sévères (rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ mmHg), limitant nos résultats à ce sous-groupe de patients. Notre population de patients témoins ne comprenait que des patients respirant spontanément, ne recevant pas d'antibiotiques au moment du prélèvement du LBA, ce qui pourrait avoir contribué aux différences entre les groupes SDRA et non-SDRA. Nous reconnaissons donc que notre travail est plus susceptible d'avoir un impact sur notre compréhension de la physiopathologie des biomarqueurs au cours du SDRA que d'implications cliniques.

Le LBA a été la deuxième source la plus courante d'échantillons pour la recherche de biomarqueurs dans le SDRA. Le principal avantage du LBA est qu'il permet d'effectuer un recueil au plus proche du site infecté, reflétant l'environnement pulmonaire local. Bien que la concentration de biomarqueurs puisse être théoriquement évaluée séquentiellement chez le même patient avec cette méthode, cette approche est limitée en raison de son caractère invasif. Le problème de la variabilité de dilution des échantillons a été souligné comme une limite de cette méthode. Cependant, nous avons choisi de ne pas normaliser les concentrations des biomarqueurs dans le LBA par les concentrations d'urée ou d'albumine plasmatiques, car aucune de ces méthodes n'a montré une amélioration de la précision des mesures effectuées [472, 473]. En cytométrie en flux, notre stratégie d'identification utilisée dans le LBA pour distinguer les monocytes alvéolaires des macrophages n'utilisait pas d'anticorps pour CD206 et CD169 [474] mais identifiait les cellules de taille intermédiaire par diffusion latérale (SSC), CD45^+ et CD14^+ . Bien que de telles méthodes aient déjà été rapportées [475], nous ne pouvons pas exclure que notre population de monocytes alvéolaires ait été contaminée par des macrophages.

Notre travail présente également certains points forts. D'une part, une méthodologie prospective, permettant un calendrier uniforme des mesures à un moment cliniquement

pertinent et la combinaison de données cliniques, de cytométrie en flux et de dosages de biomarqueurs solubles. La comparaison des patients avec un SDRA secondaire à une pneumonie à des patients témoins (sans SDRA), mais aussi des patients SDRA COVID-19 aux patients SDRA non-COVID-19, et le fait que nous avons exclu les patients présentant une immunodépression précédemment connue sont autant de points forts.

3.2. Vers une définition biologique du SDRA ?

La physiopathologie du SDRA comprend l'accumulation d'œdème pulmonaire riche en protéines dans les espaces aériens et les zones interstitielles du poumon, des degrés variables de lésions épithéliales pulmonaires, de perturbation de la perméabilité de la barrière endothéliale, la transmigration des leucocytes, ainsi qu'une altération de la clairance des fluides et des électrolytes [476]. Ces caractéristiques physiopathologiques diffèrent entre les patients, contribuant à une hétérogénéité biologique importante. Dans ce contexte, il n'est peut-être pas surprenant qu'un large éventail d'interventions pharmacologiques ciblant ces processus physiopathologiques n'ait pas réussi à améliorer le pronostic des patients [78]. Cette hétérogénéité biologique a une autre conséquence importante : il est hautement improbable qu'une seule mesure capture suffisamment la complexité du SDRA pour servir de marqueur diagnostique ou pronostique définitif et fiable. Par conséquent, une approche pour incorporer la biologie pertinente dans la définition actuelle du SDRA serait d'évaluer l'impact relatif des principaux composants physiopathologiques contributifs du SDRA, à savoir la perturbation de la barrière endothéliale, les lésions épithéliales et les réponses inflammatoires systémiques et intra-pulmonaires. Bien qu'il n'y ait aucune garantie qu'une définition biologique du SDRA conduira à de meilleures interventions thérapeutiques, il semble intuitif de penser que l'identification de sous-groupes biologiquement plus uniformes puisse faciliter l'identification de cibles modifiables.

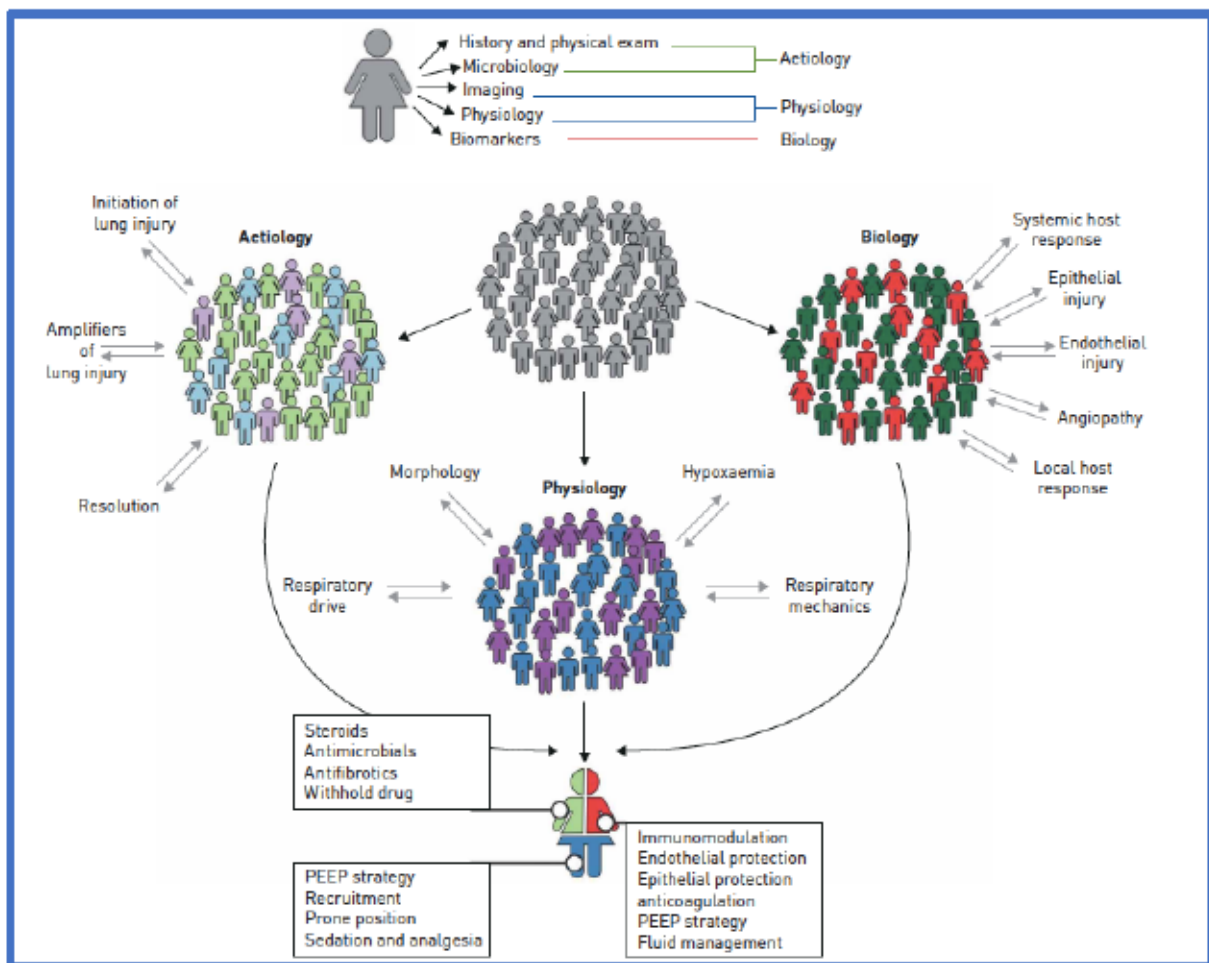
Le SDRA est un processus à multiples facettes, qui implique à la fois une inflammation alvéolaire et systémique. L'inflammation est probablement influencée par plusieurs facteurs, notamment l'étiologie du SDRA, des facteurs liés à l'hôte, l'immunomodulation, l'impact des agressions secondaires et bien d'autres. Par conséquent, les cadres conceptuels des définitions prenant en compte des marqueurs d'inflammation devront également tenir

compte des critères de site d'échantillonnage, de technique, de spécificité/sensibilité du test, ainsi que de la cinétique longitudinale des mesures de biomarqueurs inflammatoires alvéolaires et systémiques. En effet, de telles approches nécessiteront des tests rapides au chevet du patient pour permettre une cartographie en temps réel de la progression de la maladie. L'essai PHIND en cours (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT04009330) teste un panel plasmatique au lit du patient afin d'identifier en temps réel des sous-phénotypes du SDRA et déterminer si ces derniers sont associés à des pronostics différents. Les données initiales dans le cadre du SDRA COVID-19 fournissent une preuve de concept que le phénotypage des patients gravement malades peut être réalisable au lit du patient [96].

Les concentrations plasmatiques de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-8, le récepteur 1 du TNF (TNFR1) et la protéine C ont conduit à l'identification des sous-phénotypes du SDRA [37, 38, 93, 95, 428]. Les modèles statistiques qui identifient des sous-groupes homogènes de patients ont systématiquement identifié deux sous-phénotypes, un sous-phénotype « hyperinflammatoire » et un sous-phénotype « hypoinflammatoire ». Le sous-phénotype « hyperinflammatoire » est associé à un plus mauvais pronostic comme discuté plus haut [37, 38, 93, 95, 428]. Ces sous-phénotypes inflammatoires systémiques ont montré une réponse thérapeutique différentielle à la stratégie de PEP, à la gestion des fluides, à l'administration de simvastatine et aux corticostéroïdes (chez les patients atteints de SDRA lié au COVID-19) [37, 38, 93, 95, 428, 477]., soulignant leur importance potentielle dans la sous-classification des patients SDRA. Malgré ces découvertes prometteuses, les données actuellement disponibles sont insuffisantes pour identifier des endotypes homogènes et plus pertinents fondés sur des mécanismes physiopathologiques spécifiques [478]. Dans l'avenir une caractérisation plus fine des endotypes de SDRA devrait permettre d'identifier et de mesurer de manière fiable les voies biochimiques critiques chez les patients et d'éclairer le traitement sur la base d'une compréhension approfondie et hautement prédictive de la physiopathologie sous-jacente.

L'un des principaux défis de la médecine de précision est de diviser les patients en groupes homogènes suffisamment enrichis pour visualiser les effets positifs du traitement, qui nécessitent souvent des échantillons de grande taille. Pour cela, il est essentiel de comprendre les liens entre les trois sources d'hétérogénéité qui sont l'étiologie, la physiologie et la biologie **(Figure 18)**.

Figure 18. L'hétérogénéité du SDRA selon l'étiologie, la physiologie et la biologie. D'après [479].



Le SDRA peut être phénotypé sur la base d'informations dans trois domaines : l'étiologie, la physiologie et la biologie. Plusieurs phénotypes peuvent coexister entre et au sein d'un domaine (coexistence au sein d'un domaine non représentée). SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë ; PEP : pression positive en fin d'expiration.

Comme l'ont suggéré récemment Bos et coll. [39, 479], il serait souhaitable d'orienter nos efforts vers une médecine de précision et, pour ce faire, de suivre une méthodologie qui inclue entre autres de comparer les phénotypes basés sur les biomarqueurs plasmatiques à la réponse biologique pulmonaire en obtenant des échantillons simultanés des deux compartiments; d'accroître encore notre compréhension de l'hétérogénéité du SDRA en approfondissant le phénotypage et en réalisant des tests fonctionnels immunologiques. L'identification d'endotypes bien définis pourrait idéalement permettre de développer des essais reflétant l'efficacité du traitement dans la voie d'intervention cible.

IV. Conclusion

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) infectieux est associé à une mortalité élevée. Un panel de biomarqueurs pour identifier les patients septiques à risque de développer un SDRA, ou à haut risque de décès, serait intéressant pour sélectionner des patients pour des essais thérapeutiques, ce qui pourrait améliorer le diagnostic, le traitement et les chances de survie des patients atteints de SDRA septique.

Nous avons travaillé à identifier des biomarqueurs alvéolaires, mais aussi sanguins, dans le but de différencier les patients selon leur pronostic clinique et de comprendre les liens entre ces biomarqueurs et les mécanismes physiopathologiques qui gouvernent le SDRA septique. Nous avons pu développer une approche translationnelle originale, en réalisant, d'une part, une cohorte observationnelle longitudinale chez des patients atteints de SDRA septique et, d'autre part, en analysant leurs échantillons biologiques sanguins et alvéolaires à la recherche de biomarqueurs pronostiques.

Nous avons pu observer que les NETs étaient élevés dans le sang et dans le LBA et étaient associés aux taux d'IL-8 et de neutrophiles. Cependant, des niveaux plus élevés de NETs ne semblaient pas pronostiques. Nous avons aussi identifié l'IL-8 comme étant la cytokine la plus compartimentalisée et l'IL-1Ra comme la cytokine associée à la mortalité hospitalière dans le SDRA induit par une pneumonie. Par ailleurs, l'expression d'HLA-DR sur les monocytes et de PD-1 sur les lymphocytes T CD8+ étaient, certes, compartimentalisées dans l'alvéole, mais n'étaient pas associées à la mortalité hospitalière. De plus, les monocytes alvéolaires présentaient un statut désactivé et une capacité de production de cytokines inflammatoires altérée mais conservaient une activité phagocytaire similaire à celle des monocytes issus des témoins non SDRA. En revanche, le niveau d'expression d'HLA-DR sur les monocytes alvéolaires ne semblait pas être un marqueur de substitution de leur activité.

Les patients atteints de SDRA COVID-19 avaient un phénotype de réponse immunitaire adaptative altérée avec une lymphopénie profonde et une activation lymphocytaire altérée ou retardée. Ils présentaient une "signature de chimiokines" avec des concentrations sériques accrues d'IP-10 et du facteur de croissance GM-CSF associées à leur pronostic.

V. Addendum : suppléments en ligne

1. Supplément en ligne article 1: Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients with Pneumonia-related Acute Respiratory Distress Syndrome

Inès Bendib, Luc de Chaisemartin, Vanessa Granger, Frédéric Schlemmer, Bernard Maitre, Sophie Hüe, Mathieu Surenaud, Asma Beldi-Ferchiou, Guillaume Carteaux., Keyvan Razazi, Sylvie Chollet-Martin, Armand Mekontso Dessap, Nicolas de Prost.

Anesthesiology 2019; 130:581–91.

Material and Methods

Patients and data collection

All patients with severe or moderate pneumonia-related ARDS (Berlin definition [2]) were included consecutively with the following inclusion criteria: tracheal intubation and mechanical ventilation since less than 72 hours; pulmonary infection diagnosed less than 7 days before; bilateral pulmonary infiltrates on chest x-ray consistent with pulmonary edema; a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio ≤ 200 mm Hg with a positive end-expiratory pressure (PEEP) ≥ 5 cm H_2O . Non-inclusion criteria were as follows: age <18 years; pregnancy; chronic respiratory failure requiring long-term oxygen therapy; Child-Pugh C liver cirrhosis; lung fibrosis; immunosuppression (*i.e.*, HIV infection, active hematological malignancy or solid cancer receiving chemotherapy, corticosteroids therapy for more than 0.5 mg/kg/day since more than 4 weeks, organ transplant patients), SAPS II (Simplified Acute Physiology II score) > 90 , irreversible neurological disorders, patients with withholding/withdrawing of life-sustaining therapies and profound hypoxaemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 75$ mm Hg).

Control patients, (*i.e.*, patients free of ARDS, any active infection, diffuse interstitial pneumonia or immunosuppression; $n=4$) undergoing a bronchoscopy with broncho-alveolar lavage and blood sampling as part of routine care, were also included (see eTable 1 for further more details on control patients).

ARDS patients received mechanical ventilation using a standardized protective ventilation strategy [21, 64]. Other treatments, including neuromuscular blocking agents [72], nitric oxide inhalation [480], prone positioning [67] and venovenous extra-corporeal membrane

oxygenation were administered depending on the severity of ARDS [481]. The prevention of ventilator-associated pneumonias followed a multifaceted program [482]; Sedation and mechanical ventilation weaning followed standardized protocols [483].

Demographics, clinical and laboratory variables were recorded upon ICU admission, at samples collection time points (see below) and during ICU stay. Patients' severity of illness was assessed using SAPS II [484] and sequential organ failure assessment (SOFA) scores [485]. Other recorded variables included the use of adjuvant therapies for ARDS (*i.e.*, neuromuscular blocking agents, nitric oxide inhalation, prone positioning, extracorporeal membrane oxygenation), the need for hemodialysis or vasopressors, corticosteroids administration, the number of ventilator- and organ failure-free days at day 28, the duration of mechanical ventilation and of intensive care unit stay in all patients and in survivors only and intensive care unit mortality.

BAL fluid processing

During a standard flexible bronchoscopy, the bronchoscope was wedged within a bronchopulmonary segment. Four aliquots of normal saline (50 mL each) were instilled through the bronchoscope within the selected bronchopulmonary segment. After each aliquot was instilled, saline was retrieved using a negative suction pressure. Broncho-alveolar lavage fluid cytology was performed by direct microscopy after centrifuging broncho-alveolar lavage fluid samples (12 000 revolutions for 10 min) and dying under the May-Grünwald-Giemsa staining. Total (quantified in cells/mL) and differential (*i.e.*, percent of neutrophils, macrophages and lymphocytes) cell counts were measured as recommended [486].

Measurements of BAL fluid and blood NETs and cytokines levels

Broncho-alveolar lavage fluid was collected from all ARDS patients during a bronchoscopy within 48 hours of ARDS onset (day 1-2 sample) and, for patients who were alive and still had ARDS criteria five days thereafter (day 4-5 sample). Broncho-alveolar lavage fluid samples were also collected from controls during bronchoscopy. A blood sample (4 ml) for measurement of serum neutrophil extracellular traps and serum cytokines concentrations was obtained in the same time as part of routine care (see online supplementary data for further details).

NETs quantification

Neutrophil extracellular traps were specifically quantified by measuring myeloperoxidase (MPO)-DNA complexes in serum and broncho-alveolar lavage samples using a previously described capture ELISA [399] considered to be the best way to monitor NETosis *in vivo* ¹⁴. Briefly, 20 µg/ml of rabbit anti-human MPO antibody (Millipore, AB 1224) was coated overnight to 96-well microtiter plates. After blocking with 2% BSA, samples were added together with a peroxidase-labeled anti-DNA monoclonal antibody (component 2 of the Cell Death ELISA kit, Roche). After incubation, the peroxidase substrate was added for 40 min at 37 °C. Optical density was measured at 405 nm. A standard curve was obtained by dilution of a strongly positive serum. Samples were interpolated from the standard curve using the sigmoidal dose-response (variable slope) equation and results were expressed in arbitrary units (a.u.). The detection range was 4-1000 a.u..

Quantification of cytokines and biomarkers of alveolar epithelial injury

Serum and Broncho-alveolar lavage fluid concentrations of the main pro- and anti-inflammatory cytokines involved in neutrophil chemotaxis and activation (IL-6, IL-8, IL10, TNF- α [487]), as well as lung epithelium injury markers (surfactant protein D, RAGE ¹⁶) were measured by a single operator (MS) blinded to the clinical data using a Human Magnetic Luminex Assay (Biotechne – R&D Systems, Abingdon, UK) and expressed in ng/mL.

Statistical analysis

Continuous variables are reported as median [25–75th percentiles] or mean (\pm standard deviation, SD), as appropriate, and compared using Student t test or the Mann-Whitney test. Categorical variables are reported as number and percentages (95 % confidence interval) and compared using the chi² or Fischer test, as appropriate. Because no clinically relevant neutrophil extracellular traps concentration threshold value was previously reported in Broncho-alveolar lavage fluid of ARDS patients, we categorized patients according to median broncho-alveolar lavage neutrophil extracellular traps (DNA-myeloperoxidase) levels (*i.e.*, patients with “higher” versus patients with “lower” broncho-alveolar lavage neutrophil extracellular traps levels). A p value <0.05 was considered significant. Analyses were conducted using the SPSS Base 21.0 statistical software package (SPSS Inc., Chicago, IL).

REFERENCES

1. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA* 2012; 307
2. Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A, Wiedemann HP, Arroliga AC, Fisher CJ, Komara JJ, others: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342:1301–1308
3. Mercat A, Richard J-CM, Vielle B, Jaber S, Osman D, Diehl J-L, Lefrant J-Y, Prat G, Richecoeur J, Nieszkowska A, Gervais C, Baudot J, Bouadma L, Brochard L, Group for the EP (Express) S: Positive End-Expiratory Pressure Setting in Adults With Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2008; 299:646–55
4. Papazian L, Forel J-M, Gacouin A, Penot-Ragon C, Perrin G, Loundou A, Jaber S, Arnal J-M, Perez D, Seghboyan J-M, Constantin J-M, Courant P, Lefrant J-Y, Guérin C, Prat G, Morange S, Roch A: Neuromuscular Blockers in Early Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2010; 363:1107–16
5. Griffiths MJ, Evans TW: Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N Engl J Med* 2005; 353:2683–2695
6. Guérin C, Reignier J, Richard J-C, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, Mercier E, Badet M, Mercat A, Baudin O, Clavel M, Chatellier D, Jaber S, Rosselli S, Mancebo J, Sirodot M, Hilbert G, Bengler C, Richecoeur J, Gainnier M, Bayle F, Bourdin G, Leray V, Girard R, Baboi L, Ayzac L: Prone Positioning in Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2013; 368:2159–68
7. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, Brochard L, Brower R, Esteban A, Gattinoni L, Rhodes A, Slutsky AS, Vincent J-L, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ranieri VM: The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med* 2012; 38:1573–82
8. Bouadma L, Mourvillier B, Deiler V, Le Corre B, Lolom I, Régnier B, Wolff M, Lucet J-C: A multifaceted program to prevent ventilator-associated pneumonia: impact on compliance with preventive measures. *Crit Care Med* 2010; 38:789–96

9. Mekontso Dessap A, Katsahian S, Roche-Campo F, Varet H, Kouatchet A, Tomicic V, Beduneau G, Sonnevile R, Jaber S, Darmon M, Castanares-Zapatero D, Brochard L, Brun-Buisson C: Ventilator-associated pneumonia during weaning from mechanical ventilation: role of fluid management. *Chest* 2014; 146:58–65
10. Gall J-RL, Lemeshow S, Saulnier F: A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) Based on a European/North American Multicenter Study. *JAMA* 1993; 270:2957–63
11. Vincent JL, Mendonça A de, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S: Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on “sepsis-related problems” of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998; 26:1793–800
12. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, Bois RM du, Drent M, Haslam PL, Kim DS, Nagai S, Rottoli P, Saltini C, Selman M, Strange C, Wood B: An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185:1004–14
13. Granger V, Faille D, Marani V, Noël B, Gallais Y, Szely N, Flament H, Pallardy M, Chollet-Martin S, Chaisemartin L de: Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J Leukoc Biol* 2017; 102:775–81
14. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta* 2016;459:89-93.
15. Brown K, Brain S, Pearson J, Edgeworth J, Lewis S, Treacher D: Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet* 2006; 368:157–69
16. García-Laorden MI, Lorente JA, Flores C, Slutsky AS, Villar J: Biomarkers for the acute respiratory distress syndrome: how to make the diagnosis more precise. *Ann Transl Med* 2017; 5

SUPPLEMENTAL TABLES

eTable 1. Characteristics of control patients (n=4) included in the study

Variables	Control patients ^a			
Age	40	72	30	25
Gender	Male	Male	Male	Male
Immunosuppression	No	No	No	No
Comorbidities	None	Prostate cancer (2005, in remission)	None	None
Smoker	No	Yes	Yes	No
Clinical indication for bronchoscopy	Micronodules in right upper lobe	Ground glass lesions in right upper lobe + nodular lesion	Suspicion of tuberculosis	Hilar adenopathy
Characteristics upon BAL sampling				
White blood cell counts, 10 ³ /mm ³	6.4	17.4	5.0	6.0
Neutrophils	3.5	14.4	2.4	3.7
Lymphocytes	2.4	2.2	1.5	1.3

Monocytes	0.4	0.3	0.6	0.8
BAL cytology				
Total cell counts, 10 ³ /mL	77	70	197	130
Macrophages, %	87	84	66	66
Neutrophils, %	1	15	1	1
Lymphocytes, %	12	1	30	33

^aAll control patients were free of ARDS, active pulmonary infection, infiltrative lung disease, and immunosuppression

eTable 2. Microbiological documentation of patients (n=35) with pneumonia-related ARDS

	N (%)
Bacteria	18 (51.4)
<i>Enterobacteriaceae</i>	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Legionella pneumophila</i>	2
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2
Group A streptococcus	1
Virus	11 (31.4)
<i>Influenza H1N1</i>	7
<i>Rhinovirus</i>	2
<i>Respiratory syncytial virus</i>	1
<i>Metapneumovirus</i>	1
No documentation	6 (17.1)

eTable 3. Baseline characteristics of ARDS patients (n=35) having lower (n=18) or higher (n=17) broncho-alveolar lavage fluid neutrophil extracellular traps concentrations within 72 hours of intubation

Variables*	Lower BAL NETs (n=18)	Higher BAL NETs (n=17)	P value
Age, years	52.5±16.9	55.3±17.2	0.631
Gender, male	13 (72)	11 (65)	0.604
ICU admission to intubation, days	0 [0-1]	0 [0-1]	0.742
Comorbidities (%)			
Diabetes mellitus	3 (17)	5 (29)	0.443
COPD	1 (5)	3 (18)	0.338
Chronic heart failure	2 (11)	2 (12)	>0.99
Obesity	4 (22)	2 (12)	0.658
Liver cirrhosis	1(5)	2 (12)	0.603
Sickle cell disease	2 (11)	2 (12)	>0.99
Smoker	9 (50)	3 (18)	0.075
BMI, kg/cm ²	30.0±8.9	27.8±4.7	0.369
Within 24 hours of study inclusion** (moderate/severe ARDS criteria)			
SAPS II	39±14	42±18	0.657
SOFA	8±3	8±4	0.991
Temperature, Celsius degree	38.6 [37.9-39.3]	38.7 [38.0-40.0]	0.518
Shock	4 (22)	3 (18)	>0.99
ARDS severity (Berlin classification)			>0.99
<i>moderate</i>	9 (50.0)	9 (52.9)	
<i>severe</i>	9 (50.0)	8 (47.1)	
Lung injury score	2.9±0.7	2.6±0.3	0.081

C _{RS} , mL/cmH ₂ O	24 [19-26]	25 [21-28]	0.389
Driving pressure, mmHg	17.8±6.0	16.1±4.0	0.311
PaO ₂ /FiO ₂ ratio, mmHg	99 [81-160]	130 [69-186]	0.654
Tidal volume, mL/kg PBW	6.1 [5.5-6.3]	6.2 [5.9-7.1]	0.131
Plateau pressure, cmH ₂ O	28±6	25±3	0.152
PEEP, cmH ₂ O	10 [8-15]	10 [6-12]	0.248
Neuromuscular blocking agents	17 (94)	11 (65)	0.041
Prone position	6 (33)	6 (35)	>0.99
Arterial lactate levels, mmol/L	1.0 [0.8-2.9]	1.5 [1.0-2.1]	0.226
Arterial pH	7.35±0.10	7.36±0.12	0.943
Arterial PCO ₂ , mmHg	47±9	43±9	0.195
Serum creatinine, µmol/L	84 [67-156]	82 [68-142]	0.961
White blood cells, 10 ³ /mm ³	13.2±8.8	14.7±7.5	0.592
Blood neutrophils, 10 ³ /mm ³	12.3±7.3	11.1±6.0	0.603
Blood platelets, 10 ³ /mm ³	207±94	257±138	0.212
Blood hemoglobin level, g/dL	11.6±2.7	10.3±1.5	0.106
Upon BAL 1 sampling			
Intubation to 1 st BAL, days	1 [1-1]	1 [0-2]	0.902
SOFA	8±4	8±3	0.952
Temperature, Celsius degree	38.5 [37.5-39.0]	38.3 [37.9-39.7]	0.831
Shock	4 (22)	2 (12)	>0.99
Microbiological documentation			0.621
<i>Bacteria</i>	9 (50.0)	8 (47.0)	
<i>Virus</i>	6 (33.3)	5 (29.4)	
<i>Bacteria + virus</i>	1 (5.5)	0 (0.0)	
<i>None</i>	2 (11.1)	4 (23.5)	

Lung injury score	2.7±0.5	2.4±0.5	0.076
C _{RS} , mL/cmH ₂ O	28 [24-37]	32 [24-43]	0.262
Driving pressure, mmHg	13.7±2.7	11.9±3.1	0.073
PaO ₂ /FiO ₂ ratio, mmHg	142 [103-193]	242 [149-350]	0.006
Tidal volume, mL/kg PBW	5.8 [5.0-6.2]	6.2 [5.9-6.7]	0.021
Plateau pressure, cmH ₂ O	24±3	23±4	0.434
PEEP, cmH ₂ O	10 [8-14]	12 [9-14]	0.849
Neuromuscular blocking agents	13 (72.2)	11 (64.7)	0.725
Prone position	6 (33)	8 (47)	0.500
Arterial lactate levels, mmol/L	1.1 [0.8-2.3]	1.4 [1.0-1.7]	0.987
Arterial pH	7.37±0.11	7.38±0.08	0.796
Arterial PCO ₂ , mmHg	49±13	42±7	0.132
Serum creatinine, µmol/L	105 [62-155]	81 [62-225]	0.902
White blood cells, 10 ³ /mm ³	11.7±7.8	15.6±8.2	0.150
Blood neutrophils, 10 ³ /mm ³	9.3±6.6	13.6±7.4	0.091
Blood platelets, 10 ³ /mm ³	193±104	240±113	0.116
Shock dose steroids	3 (17)	1 (6)	>0.99

Continuous variables are presented as mean ± standard deviation when normally distributed and median [1st-3rd quartiles] otherwise; P values come from the unpaired t-test or the Mann-Whitney test, as appropriate; Categorical variables are shown as n (%); P values come from the chi² or the Fisher exact test, as appropriate; * None of the data pertaining to this table was missing; ** Worst values recorded; ARDS, acute respiratory distress syndrome; BAL: bronchoalveolar lavage fluid; NETs, neutrophil extracellular traps; ICU, intensive care unit; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; BMI, body mass index; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II; SOFA, Sequential Assessment of Organ Failures; PEEP, positive end-expiratory pressure; PBW, predicted body weight;

eTable 4. Measurement of neutrophil extracellular traps concentrations in the alveolar and blood compartments in ARDS patients (n=35) having lower (n=18) or higher (n=17) bronchoalveolar lavage fluid neutrophil extracellular traps concentrations within 72 hours of intubation

	Lower BAL NETs (n=18)	Higher BAL NETs (n=17)	P value
Alveolar compartment			
BAL Fluid NETs levels, AU	74 [52-104]	1000 [533-1000]	<0.0001
Blood compartment			
Serum NETs levels*, AU	25 [4-58]	30 [8-93]	0.39

AU: arbitrary units, BAL: bronchoalveolar lavage fluid; NETs, neutrophil extracellular traps; * Serum NETs levels value was missing for one patient; P values come from the Mann-Whitney test.

eTable 5. Correlation matrix exploring the relationship between serum neutrophil extracellular traps concentrations, serum cytokines, and serum alveolar epithelium injury biomarkers levels.

BAL biomarkers		NETs (o.d.)	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- α	SP-D	RAGE
NETs (o.d.)	Rho	1.000	0.151	-0.126	-0.135	-0.001	0.167	0.005
	P value	-	0.402	0.486	0.452	0.996	0.352	0.980
	N	34	33	33	33	33	33	33
IL-6	Rho		1.000	0.722	0.495	0.485	-0.472	0.239
	P value		-	<0.0001	0.003	0.004	0.005	0.173
	N		34	34	34	34	34	34
IL-8	Rho			1.000	0.364	0.405	-0.212	0.425
	P value			-	0.034	0.017	0.229	0.012
	N			34	34	34	34	34
IL-10	Rho				1.000	0.658	-0.527	0.349
	P value				-	<0.0001	0.001	0.043
	N				34	34	34	34
TNF- α	Rho					1.000	-0.456	0.511
	P value					-	0.007	0.002
	N					34	34	34
SP-D	Rho						1.000	-0.099
	P value						-	0.577
	N						34	34
RAGE	Rho							1.000
	P value							-
	N							34

P values and correlation coefficients (rho) were computed using the Spearman's test; NETs, neutrophil extracellular traps; NETs concentrations were expressed in optical densities (o.d.); N indicates the number of samples available for each biomarker.

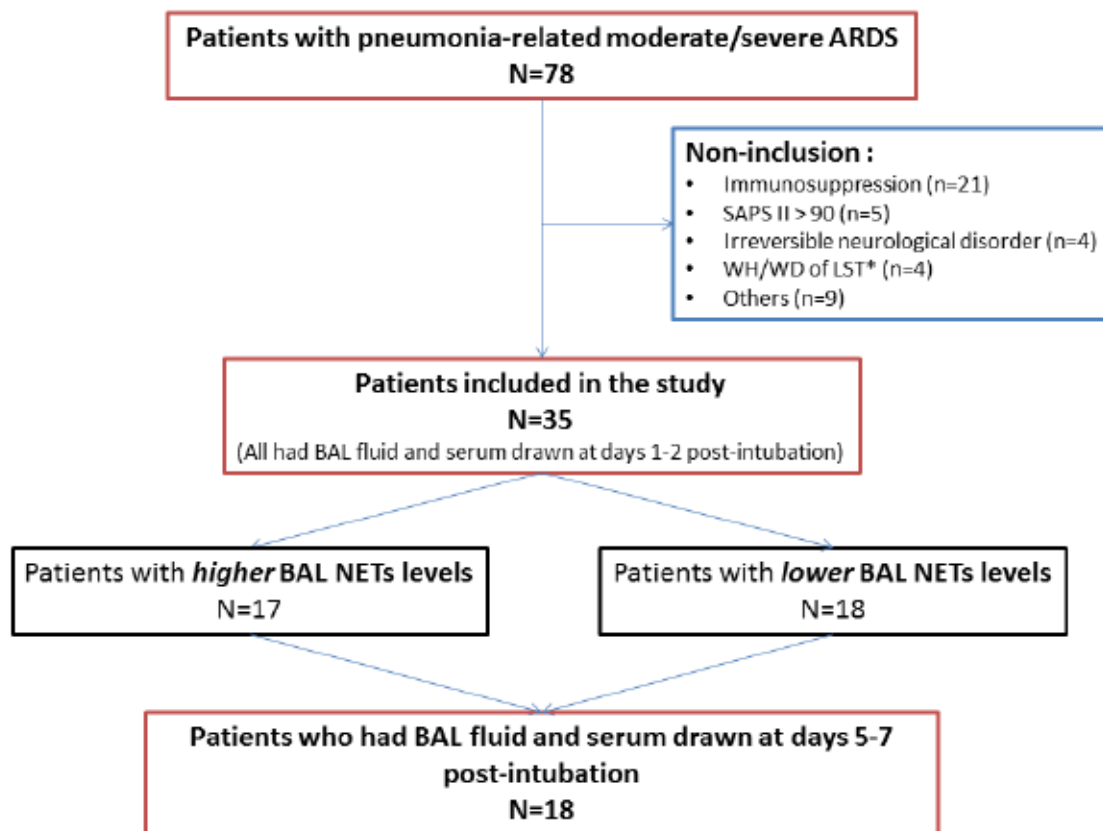
eTable 6. Exploratory uni- and multiple regression analysis using live ventilator-free days at day 28 as the dependent variable.

Independent variable	Univariable analysis			Multivariable analysis		
	β coefficient	95% CI of the β coefficient	P value	β coefficient	95% CI of the β coefficient	P value
NET BAL levels (o.d.)	3.70	-0.87 ; 8.30	0.084	2.40	-2.13 ; 6.92	0.288
PaO ₂ /FiO ₂ ratio *	0.03	-0.01 ; 0.06	0.097	0.01	-0.33 ; 0.36	0.934
Tidal volume *	3.66	1.24 ; 6.09	0.004	3.31	0.48 ; 6.13	0.023

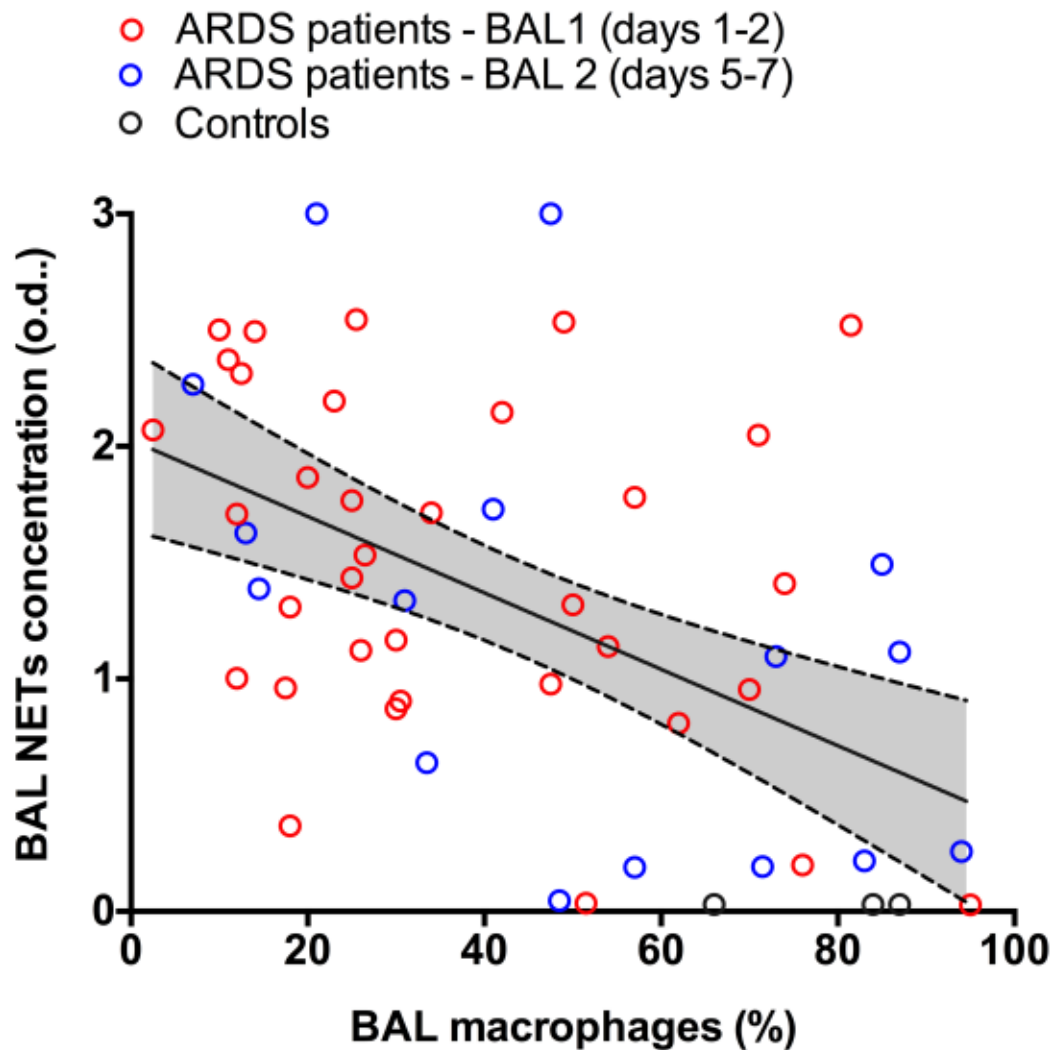
* Upon BAL 1 collection; CI, confidence interval; p values come from uni- and multiple linear regression

SUPPLEMENTAL FIGURES

eFigure 1. Flow chart of patients with pneumonia-related moderate/severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) included in the study. * Withholding/Withdrawal of life-sustaining therapies; BAL, broncho-alveolar lavage; NETs, neutrophil extracellular traps; ** Reasons for not performing the second BAL included deceased patients (n=5), extubated patients (n=10) or patient mechanically ventilated but not meeting ARDS criteria at day 5-7 (n=2).



eFigure 2. Linear regression of BAL fluid neutrophil extracellular traps (NETs, DNA-MPO) levels on alveolar macrophages. There was a significant invert relationship between BAL fluid NETs, expressed as optical density (o.d.) values and alveolar macrophages, as a percentage of total BAL cell numbers ($y=-0.016x + 2.027$; $r^2=0.26$; $p<0.0001$), from ARDS patients sampled at days 1-2 (n=35; red circles) and days 5-7 (n=18; blue circles) and controls (n=4; black circles). The grayed area comprised between the dashed curves depicts the 95% confidence interval of the regression line.



2. Supplément en ligne article 2: Alveolar compartmentalization of inflammatory and immune cell biomarkers in pneumonia-related ARDS

Inès Bendib ; Asma Beldi-Ferchiou ; Frédéric Schlemmer ; Mathieu Surenaud ; Bernard Maitre ; Anne Plonquet ; Guillaume Carteaux ; Keyvan Razazi ; Veronique Godot ; Sophie Hüe; Armand Mekontso Dessap, Nicolas de Prost.

Crit Care 2021 ;25(1):23.

Additional file 1: Table S1. Characteristics of control patients (n=7) included in the study

Variables	Control patients ^a						
	1	2	3	4	5	6	7
Age	40	72	30	25	40	25	67
Gender	Male	Male	Male	Male	Female	Male	Male
Immunosuppression	No	No	No	No	No	No	No
Comorbidities	None	Prostate cancer (2005, in remission)	None	None	None	None	Ischemic heart disease, hypertension, COPD
Smoker	No	Yes	Yes	No	No	No	Yes

Clinical indication for bronchoscopy	Micronodules in RUL	Ground glass lesions in right upper lobe + nodular lesion	Suspicion of tuberculosis	Hilar adenopathy	Lung micronodules and positive IFN- γ release assay	Weight loss, hilar bilateral lymphadenopathy and interstitial abnormalities	Pulmonary isolated cysts in RLL in context of medical history of cerebral adenocarcinoma and smoking
Characteristics upon BAL sampling							
WBC counts, 10³/mm³	6.4	17.4	5.0	6.0	6.4	6	12.2
Neutrophils	3.5	14.4	2.4	3.7	3.5	3.7	9
Lymphocytes	2.4	2.2	1.5	1.3	2.4	1.3	1.3
Monocytes	0.4	0.3	0.6	0.8	0.4	0.7	0.7
BAL cytology							
Cell counts, 10³/mL	77	70	197	130	77	130	143.3
Macrophages, %	87	84	66	66	87	66	29
Neutrophils, %	1	15	1	1	0	0.5	1
Lymphocytes, %	12	1	30	33	13	33	49

Final diagnosis	Connective tissue disease	Asthma	Vasculitis	No clear diagnosis	No clear diagnosis	Disseminated tuberculosis	Lung cancer
------------------------	---------------------------	--------	------------	--------------------	--------------------	---------------------------	-------------

^aAll control patients were free of ARDS, active pulmonary infection, infiltrative lung disease, and immunosuppression; RLL, right lower lobe; RUL, right upper lobe

Additional file 1: Table S2. Microbiological documentation of patients (n=70) with pneumonia-related ARDS

	N (%)
Bacteria	47 (67%)^a
<i>Enterobacteriaceae</i>	16
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	7
<i>Legionella pneumophila</i>	4
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2
Group A streptococcus	2
<i>Haemophilus influenzae</i>	3
Virus	18 (26%)^a
<i>Influenza A (H1N1)pdm2009</i>	11
<i>Rhinovirus</i>	2
<i>Respiratory syncytial virus</i>	2
<i>Metapneumovirus</i>	1
<i>Adenovirus/ Coronavirus</i>	3
No documentation	9 (13%)

^a Including four patients with bacterial-viral co-infection

Additional file 1: Table S3. Measurements of cytokines and epithelial/endothelial injury biomarkers in serum and broncho-alveolar lavage (BAL) fluid in ARDS patients who survived (n=55) or died (n=15) in the hospital.

Biomarkers ^a	Serum concentrations			BAL fluid concentrations		
	Survived (n=55)	Died (n=15)	P value/adjusted p value ^b	Survived (n=55)	Died (n=15)	P value/adjusted p value ^b
TNF-α	27.0 [24.1-35.2]	32.0 [24.0-45.2]	0.390	48.7 [35.7-97.0]	41.0 [27.0-130.5]	0.396
IL-10	38.0 [29.0-69.0]	55.5 [37.5-65.5]	0.192	60.0 [43.0-97.6]	62.0 [39.7-80.0]	0.374
IFN-γ	29.0 [27.0-32.1]	29.0 [18.5-33.5]	0.867	42.7 [35.0-59.0]	34.5 [24.0-46.5]	0.042/0.115
IP-10/CXCL10	387.7 [185.7-4322.9]	1797.0 [818.5-6559.0]	0.143	3255.2 [717.5-18119.2]	3176.5 [1051.0-12385.5]	0.937
IL-17a	25.0 [24.0-28.0]	25.0 [15.0-28.0]	0.445	29.2 [26.7-34.1]	28.0 [19.2-32.7]	0.382
IL-8	178.5 [107.7-436.7]	261.0 [177.5-677.5]	0.222	4520.0 [2533.7-8399.7]	4712 [1965.5-7258.5]	0.704
IL-6	400.2 [203.2-2500.9]	1072.0 [260.0-4399.2]	0.420	2596.0 [709.7-8400.1]	2214.0 [432.5-6960.2]	0.775
IL-1Ra	2995.0 [1697.7-6185.5]	3750.0 [1501.9-7357.7]	0.830	3105.5 [1671.7-6094.9]	2017.0 [720.6-3603.0]	0.049/0.069
IL-13	33.0 [25.5-50.0]	30.5 [16.7-66.7]	0.470	19.0 [16.0-23.2]	17.0 [14.0-20.0]	0.042/0.122
SP-D	1381.2 [621.2-2399.6]	1338.0 [581.2-2733.5]	0.939	8173.5 [4435.1-10195.0]	4947.0 [3575.7-9236.5]	0.260
GM-CSF	28.0 [24.0-31.7]	28.0 [26.0-35.0]	0.982	43.5 [31.0-62.4]	44.0 [32.2-74.5]	0.692

Amphiregulin	11.0 [10.0-12.0]	11.0 [10.0-12.2]	1.0	15.5 [12.4-24.2]	14.0 [11.5-16.0]	0.170
IL12-23p40	22.0 [20.0-23.0]	22.0 [19.0-25.7]	0.621	28.2 [24.7-35.5]	26.0 [19.5-31.5]	0.222
Ang2	2075.7 [926.5-3089.7]	2941.0 [1705.1-5389.6]	0.160	59.5 [35.7-135.8]	67.0 [35.0-210.9]	0.905
Ang1	5227.0 [3333.2-6941.1]	3960.0 [1218.2-5513.5]	0.091	27.0 [22.0-51.7]	26.0 [20.0-39.5]	0.396
ICAM1	4509.7 [3516.4-6892.6]	4202.0 [3507.2-9696.2]	0.490	1976.5 [456.7-4246.7]	1435.0 [503.0-2460.0]	0.401
vWF	84.5 [70.4-115.9]	96.0 [83.7-124.7]	0.254	29.0 [24.0-37.2]	24.0 [21.5-33.5]	0.163
RAGE	1040.0 [685.5-1402.0]	1421.0 [1053.5-2021.2]	0.035/0.207	2877.0 [1147.2-4176.0]	1950.0 [632.5-3682.7]	0.256
VEGF	131.7 [62.7-272.4]	52.7 [25.4-197.7]	0.113	23.5 [11.9-50.0]	36.7 [12.1-52.1]	0.600
IL-7	22.0 [17.0-30.7]	26.0 [15.2-34.2]	0.781	11.0 [11.0-12.0]	11.0 [10.0-11.2]	0.245
RANTES	2741.5 [1747.5-4311.1]	1882.2 [334.4-3809.4]	0.084	63.5 [33.6-134.2]	42.0 [31.7-137.4]	0.549
SerpinE1_PA11	2159.0 [1707.7-3576.7]	2858.0 [1934.1-3886.0]	0.537	5690.2 [1464.7-13860.0]	5263.0 [622.2-10730.0]	0.480

Variables are expressed as median [1st-3rd quartiles]; ^a All cytokine concentrations are expressed as fluorescence intensity values; ^b Values yielding statistical significance at the p<0.05 level were adjusted for driving pressure and SOFA; **Bolded** results are significant at the p<0.05 level.

Additional file 1: Table S4. Uni- and multiple logistic regression analyses exploring the relationship between broncho-alveolar monocytic HLA-DR expression (BAL HLA-DR_m) and BAL-to-blood ratio of HLA-DR_m and hospital mortality (dependent variable).

Independent variables	Univariable analysis		Multivariable analysis	
	OR (95% CI)	P	aOR (95% CI)	P
<i>Model 1 (BAL HLA-DR_m expressed as a continuous variable in percentage)</i>				
BAL HLA-DR _m (%)	0.99 [0.95-1.02]	0.451	0.99 [0.96-1.04]	0.955
SOFA, per point	1.15 [0.97-1.36]	0.107	1.13 [0.92-1.38]	0.237
Driving pressure, per mmHg	1.14 [0.99-1.33]	0.074	1.13 [0.95-1.33]	0.158
<i>Model 2 (BAL HLA-DR_m expressed as a continuous variable in MFI)</i>				
BAL HLA-DR _m (MFI)	0.99 [0.95-1.02]	0.451	1.01 [0.99-1.02]	0.136
SOFA, per point	1.15 [0.97-1.36]	0.107	1.21 [0.97-1.49]	0.083
Driving pressure, per mmHg	1.14 [0.99-1.33]	0.074	1.11 [0.95-1.31]	0.197
<i>Model 3 (BAL to blood ratio of HLA-DR_m expressed as a continuous variable in percentage)</i>				
BAL/blood HLA-DR _m (%)	0.99 [0.95-1.05]	0.950	1.00 [0.95-1.06]	0.925
SOFA, per point	1.15 [0.97-1.36]	0.107	1.13 [0.94-1.37]	0.193

Driving pressure, per mmHg	1.14 [0.99- 1.33]	0.074	1.13 [0.95- 1.33]	0.158
<i>Model 4 (BAL to blood ratio of HLA-DR_m expressed as a continuous variable in MFI)</i>				
BAL/blood HLA-DR _m (MFI)	1.01 [0.99- 1.03]	0.155	1.02 [0.99- 1.04]	0.070
SOFA, per point	1.15 [0.97- 1.36]	0.107	1.23 [0.99- 1.28]	0.062
Driving pressure, per mmHg	1.14 [0.99- 1.33]	0.074	1.08 [0.92- 1.28]	0.334

OR, odds ratio; CI; Confidence interval; aOR, adjusted odds ratio; MFI, mean fluorescence intensity;

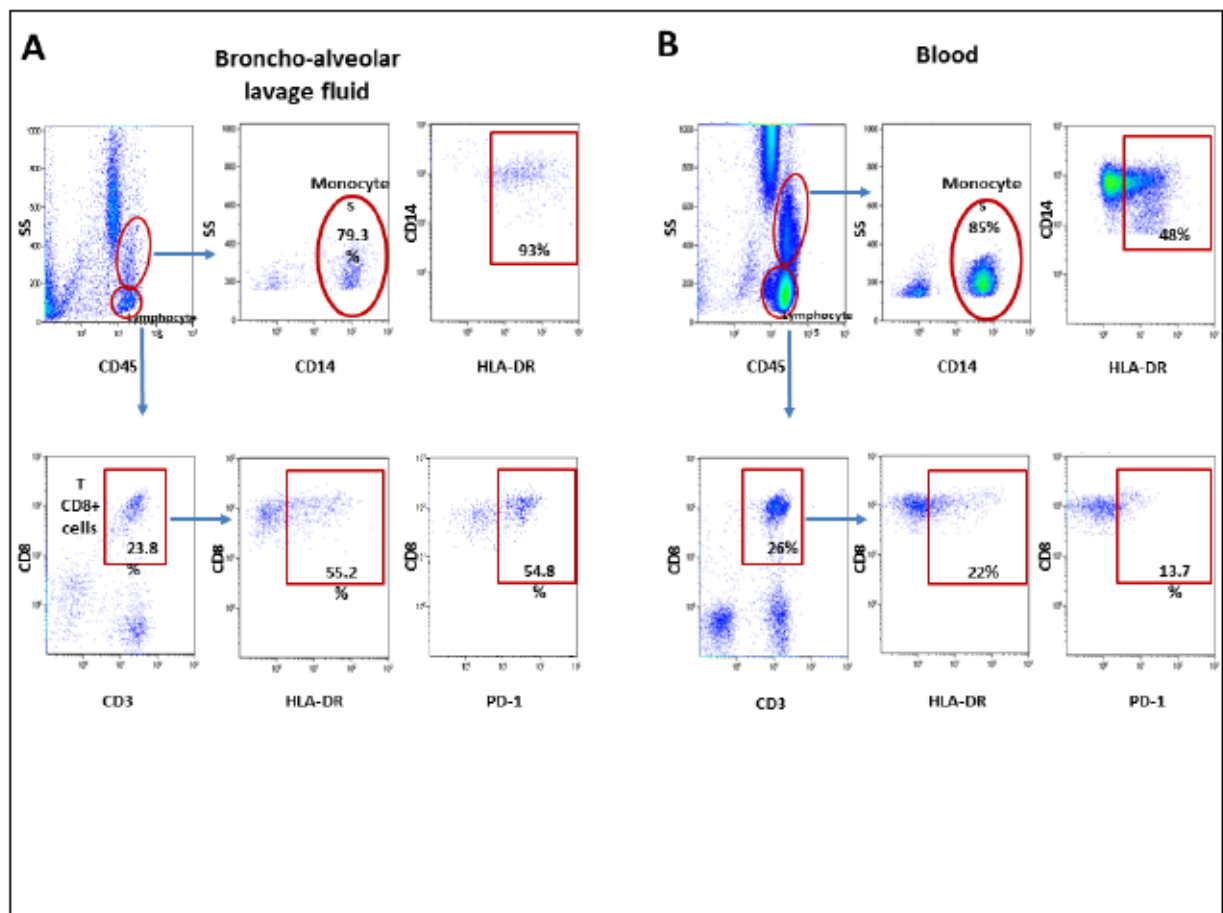
Additional file 1: Table S5. Uni- and multiple logistic regression analyses exploring the relationship between broncho-alveolar CD8+ lymphocytes PD1 (CD8+ PD1+) expression and BAL-to-blood ratio of CD8+ PD1+ and hospital mortality (dependent variable)

Independent variables	Univariable analysis		Multivariable analysis	
	OR (95% CI)	p	aOR (95% CI)	p
<i>Model 1 (BAL PD1 expressed as a continuous variable in percentage)</i>				
BAL PD1 (%)	0.99 [0.96-1.02]	0.474	0.99 [0.97-1.03]	>0.99
SOFA, per point	1.15 [0.97-1.36]	0.107	1.10 [0.90-1.35]	0.335
Driving pressure, per mmHg	1.14 [0.99-1.33]	0.074	1.12 [0.95-1.33]	0.171
<i>Model 2 (BAL PD1 expressed as a continuous variable in MFI)</i>				
BAL PD1 (MFI)	0.99 [0.95-1.02]	0.451	0.99 [0.94-1.04]	0.630
SOFA, per point	1.15 [0.97-1.36]	0.107	1.10 [0.90-1.34]	0.354
Driving pressure, per mmHg	1.14 [0.99-1.33]	0.074	1.11 [0.94-1.30]	0.216
<i>Model 3 (BAL to blood ratio of PD1 expressed as a continuous variable in percentage)</i>				
BAL/blood PD1+ CD8+ cells (%)	0.99 [0.60-1.65]	0.995	1.09 [0.64-1.86]	0.740
SOFA, per point	1.15 [0.97-1.36]	0.107	1.11 [0.91-1.35]	0.315
Driving pressure, per mmHg	1.14 [0.99-1.33]	0.074	1.13 [0.96-1.34]	0.151
<i>Model 4 (BAL to blood ratio of PD1 expressed as a continuous variable in MFI)</i>				
BAL/blood PD1+ CD8+ cells (MFI)	0.97 [0.84-1.13]	0.738	0.99 [0.85-1.14]	0.889
SOFA, per point	1.15 [0.97-1.36]	0.107	1.13 [0.92-1.35]	0.281
Driving pressure, per mmHg	1.14 [0.99-1.33]	0.074	1.11 [0.94-1.30]	0.205

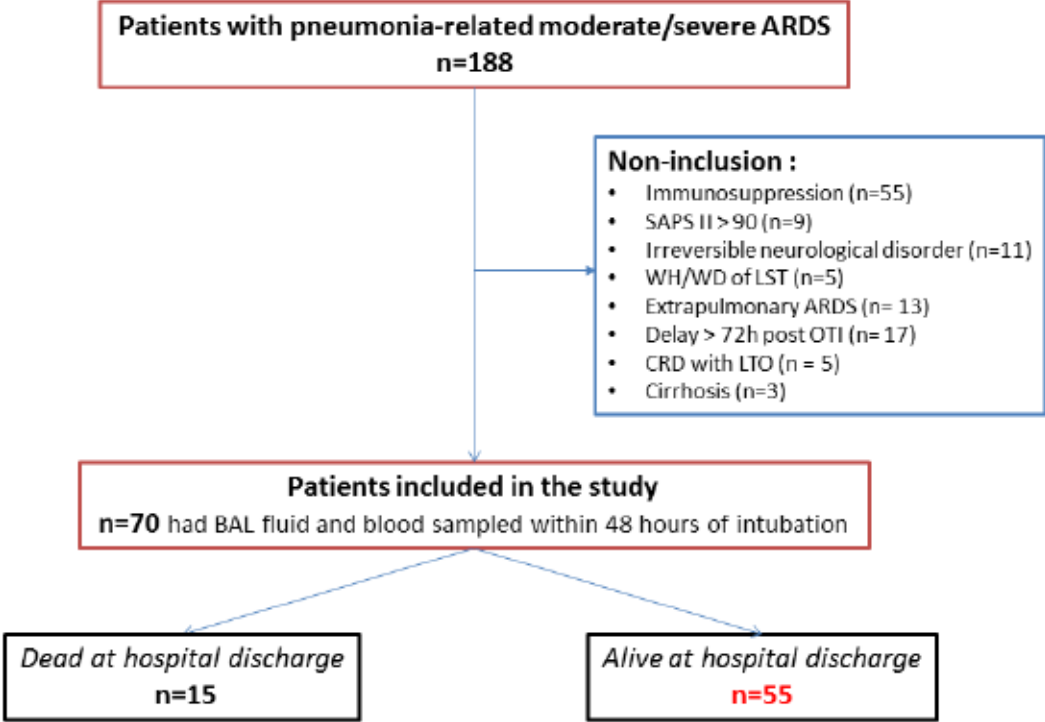
OR, odds ratio; CI; Confidence interval; aOR, adjusted odds ratio; MFI, mean fluorescence intensity;

Additional file 1: Figure S1. Gating strategy of flow cytometric analyses of monocytes and T-cell subsets in broncho-alveolar lavage fluid (A) and blood (B).

The same gating strategy was used in blood and BAL fluid samples. Monocytes, and lymphocytes were first gated on a side scatter-area (SSC-A) versus CD45 (the leukocyte common antigen) flow cytometry dot plots. Monocytes were defined as Side Scatter (SS) intermediate, CD45⁺ and CD14⁺ cells. Expression of HLA-DR was then analyzed (upper panel in A and B). T CD8⁺ lymphocytes were identified as CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ cells within the CD45⁺ SS low lymphocyte gate. Expression of PD-1 was then analyzed on T CD8⁺ lymphocytes (lower panel in A and B). HLA-DR and PD-1 quantification was expressed in percentage or mean fluorescence of intensity (MFI).



Additional file 1: Figure S2. Flow chart of patients with pneumonia-related moderate/severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) included in the study.

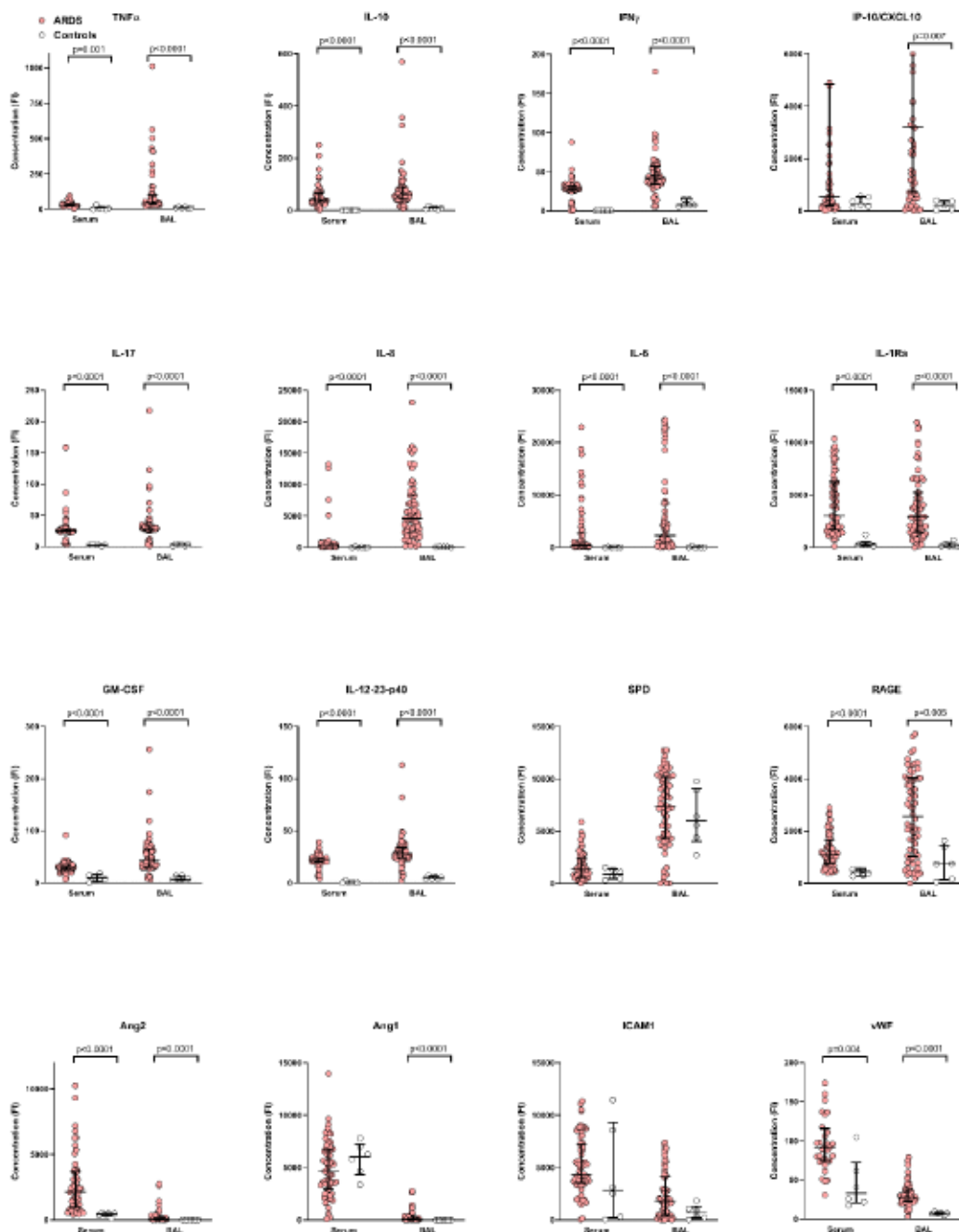


BAL, broncho-alveolar lavage; CRD: chronic respiratory disease; LTO: long term oxygenotherapy; OTI: oro-tracheal intubation; WH/WD of LST: withholding/withdrawal of life-sustaining therapies.

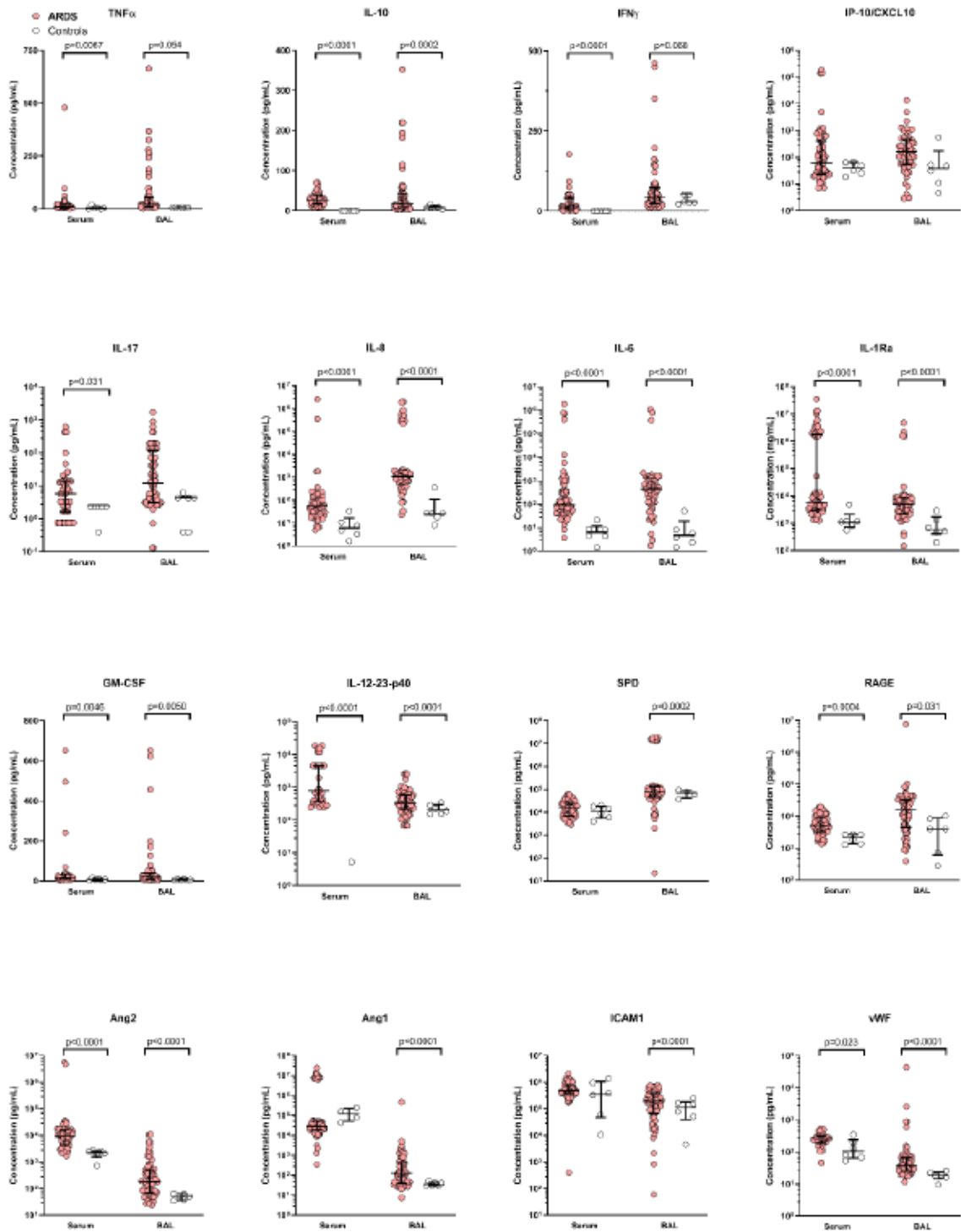
Additional file 1: Figure S3.

Serum and broncho-alveolar lavage (BAL) fluid concentrations of biomarkers associated with the acute respiratory distress syndrome (ARDS). Red circles correspond to ARDS patients (n=70) and open circles to controls (n=6). Concentrations are expressed in fluorescence intensity (A) or pg/mL (B; note that some of the subfigures are presented with a log scale). P values come from the Mann-Whitney test.

A.

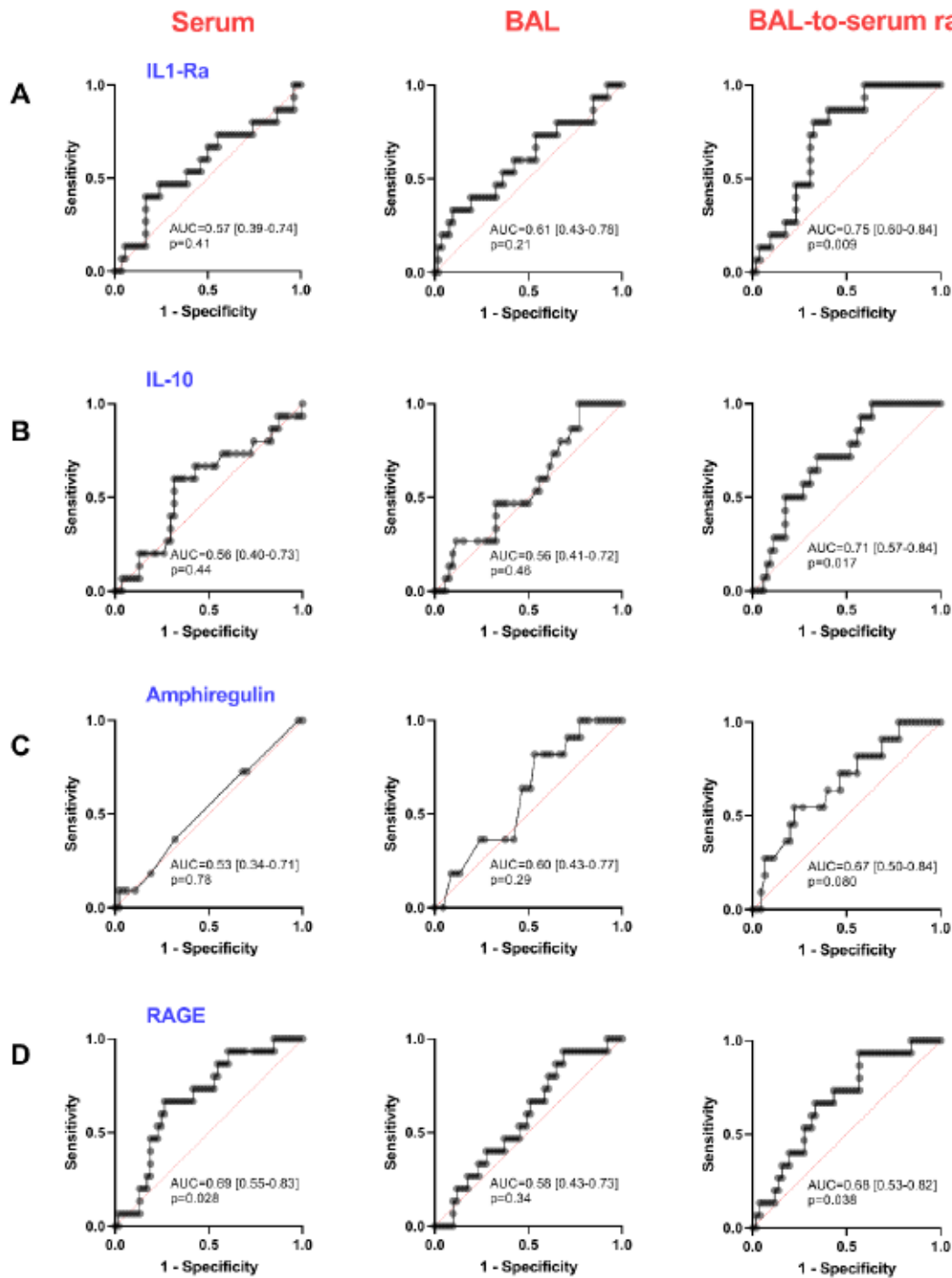


B.



Additional file 1: Figure S4.

Receiver Operating Characteristic (ROC) curves for biomarkers obtained in serum (left column), broncho-alveolar lavage (BAL) fluid (middle column), and BAL fluid -to-serum ratio, and hospital mortality. A) IL-1Ra; B) IL-10; C) Amphiregulin; D) RAGE. The area under the curve (AUC) is provided and its 95% confidence interval is displayed between brackets.



3. Suppléments en ligne article 3: Functional Ex Vivo Testing of Alveolar Monocytes in Patients with Pneumonia-Related ARDS

Inès Bendib, Asma Beldi-Ferchiou, Frédéric Schlemmer, Bernard Maitre, Mathieu Surenaud, Sophie Hüe, Guillaume Carteaux, Keyvan Razazi, Jean-Daniel Lelièvre, Yves Lévy, Armand Mekontso Dessap, Véronique Godot† et Nicolas de Prost†.

Cells 2021 ; 10(12):3546.

† contribution égale

Additional Methods

BAL fluid and blood sampling

BAL fluid was collected from all ARDS patients during a bronchoscopy within 48 hours of ARDS onset. BAL fluid samples were also collected from control patients. Concomitant heparin anticoagulated blood samples were obtained in ARDS and control patients. Samples were stored at room temperature and analyzed within 2 hours.

During a standard flexible bronchoscopy, the bronchoscope was wedged within a bronchopulmonary segment. Four aliquots of normal saline (50 mL each) were instilled through the bronchoscope within the selected bronchopulmonary segment.

After each aliquot was instilled, saline was retrieved using a negative suction pressure. BAL samples were filtered through a 100µm cell strainer; centrifugated and BAL cells were then collected in phosphate buffered saline solution. BAL fluid cytology was performed by direct microscopy after centrifuging broncho-alveolar lavage fluid samples (12 000 revolutions for 10 min) and dying under the May-Grünwald-Giemsa staining. Total (quantified in cells/mL) and differential (i.e., percent of neutrophils, macrophages and lymphocytes) cell counts were measured as recommended [1].

Phagocytosis assay

After treatment with *E. coli* LPS (200 ng/ml) or medium alone, a fraction of blood and BAL fluid samples were incubated 30 min with 20 µL of fluorescent *E. coli* particles (*fluorescent pHrodo™ Green E.coli BioParticles*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), as recommended by the furnisher, either at 37°C and 5% CO₂ to evaluate the phagocytic activity of cells or at +4°C to assess fluorescent background for bound but not internalized bacteria. At the end of the incubation period, all samples were put into ice to stop the phagocytosis process. Red cells were then lysed using pHrodo™ BioParticles® Phagocytosis kit for flow cytometry (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following the furnisher's instructions. After two successive washings done with 1X Phosphate buffered saline (PBS), cells were further immunophenotyped. Phagocytosis was quantified on both alveolar and circulating monocytes using Fli/FITC channel and expressed both in % of positive cells and in delta MFI by retrieving basal MFI of unstained cells.

Immunophenotyping

Blood and BAL fluid surface immunostaining was performed as follows: 100 µL of whole blood or BAL fluid were incubated during 15 min at room temperature in the dark with the following conjugated-monoclonal antibodies: CD14-ECD/ HLADR-PACBLUE/ PDL1-BV785 and, for alveolar samples CD45-AF700 and CD169-AF647

were added to identify alveolar monocytes [25] (all antibodies were from BD Biosciences, San Jose, CA, USA), eBioscience (San Diego, CA, USA) or Beckman Coulter (Brea, CA, USA). A *LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to this panel to determine cellular viability. After washing steps, cells were fixed with PBS 1% PFA and further acquired with a LSRII cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) within 48 hours. Flow cytometer analyses were performed with the FlowJo software (version 10 ; *Tree Star*, Ashland, OR, USA). HLA-DR and PD-L1 quantification was expressed in percentages of positive monocytes (% positive cells) among the total monocyte population or in delta MFI. Flow cytometry results were expressed both in percentage of positive cells and delta MFI. A difference might be observed between percentage of positive cells and MFI as these provide different information: percentage of positive cells reflects the amount of monocytes expressing the biomarker of interest, while MFI is the geometric mean of the biomarker fluorescence on each monocyte.

Assessment of TNF production by intracellular staining

After treatment with *E. coli* LPS (200 ng/ml) or medium alone, blood and BAL fluid samples were immunophenotyped and further used to quantify intracellular TNF synthesis according to the regular PerFix-no centrifuge (nc) (Beckman Coulter, Brea, Calif) procedure. In brief, fixation of the samples was conducted for 20 min at room temperature, applying 200 µL of PerFix-nc Fixative Reagent, followed by 20 min permeabilization and concomitant staining at room temperature in the dark. Dried TNF-PC7 antibodies from BD Biosciences (San Jose, CA, USA) and eBioscience (San Diego, CA, USA) were resuspended extemporaneously with 50 µL of the permeabilizing reagent per staining before use. Finally, the reaction was terminated by adding 2.5 mL of PerFix-nc final reagent. Cells were then fixed with PBS 1% PFA and further acquired with a LSRII cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) within 48 hours. Flow cytometer analyses were performed with the FlowJo software (version 10 ; *Tree Star*, Ashland, OR, USA). TNF quantification was expressed in percentages of positive monocytes (% positive cells) among the total monocyte population (positivity threshold was defined with non-stimulated values from the same donor) or in delta MFI.

Figure S1 Gating strategy of flow cytometric analyses of monocytes in broncho-alveolar lavage fluid (a,b) and blood (c,d). In broncho-alveolar lavage (BAL) fluid, we represented living singlet cells on a CD14 versus CD45 (the leukocyte common antigen) dot blot. The subsequent CD14+ CD45+ cells were then examined in a forward scatter-area (FSC-A) versus CD169 dot blot to distinguish alveolar monocytes (FSC-A^{low}CD14+ CD169-) from alveolar macrophages (FSC-A^{low}CD14+ CD169+) [2]. Then, HLA-DR and PD-L1 expression as well as Phrodo (*E. coli* fluorescent particles) internalization were assessed on alveolar monocytes (panel a). To set up the positive threshold of HLA-DR and PD-L1 staining from background, we considered both the autofluorescence of unstained cells and the unspecific staining detected on CD45- CD14- cells (not shown). For Phrodo/*E. coli* internalization, we considered the autofluorescence of unstained cells and Phrodo background due to its binding on cell surface. Phrodo background was evaluated on alveolar cells incubated at +4°C. The LPS-induced TNF expression was assessed in alveolar monocytes after a step of permeabilization (panel b). To set the positive threshold of TNF staining, we considered the background observed in unstimulated control cells. For blood samples, we represented living singlet cells on a FSC-A versus CD14 dot blot (panel c). Monocytes were then identified as FSC-A^{low}CD14+ cells. Then, HLA-DR and PD-L1 expression as well as Phrodo internalization were assessed on FSC-A^{low}CD14+ circulating monocytes. To set up the positive threshold of HLA-DR and PD-L1 staining from background, we considered the autofluorescence of unstained cells and the unspecific staining detected on FSC-A^{low}SSC-A (side scatter-area) low non-granulocytic and non-myeloid cells (not shown). For Phrodo/*E. coli* internalization, we considered the autofluorescence of unstained cells and Phrodo background due to its binding on cell surface. Phrodo background was evaluated on circulating monocytes incubated at +4°C. The LPS-induced TNF expression was assessed in circulating monocytes after a step of permeabilization (panel d). To set the positive threshold of TNF staining, we considered the background observed in unstimulated control circulating monocytes.

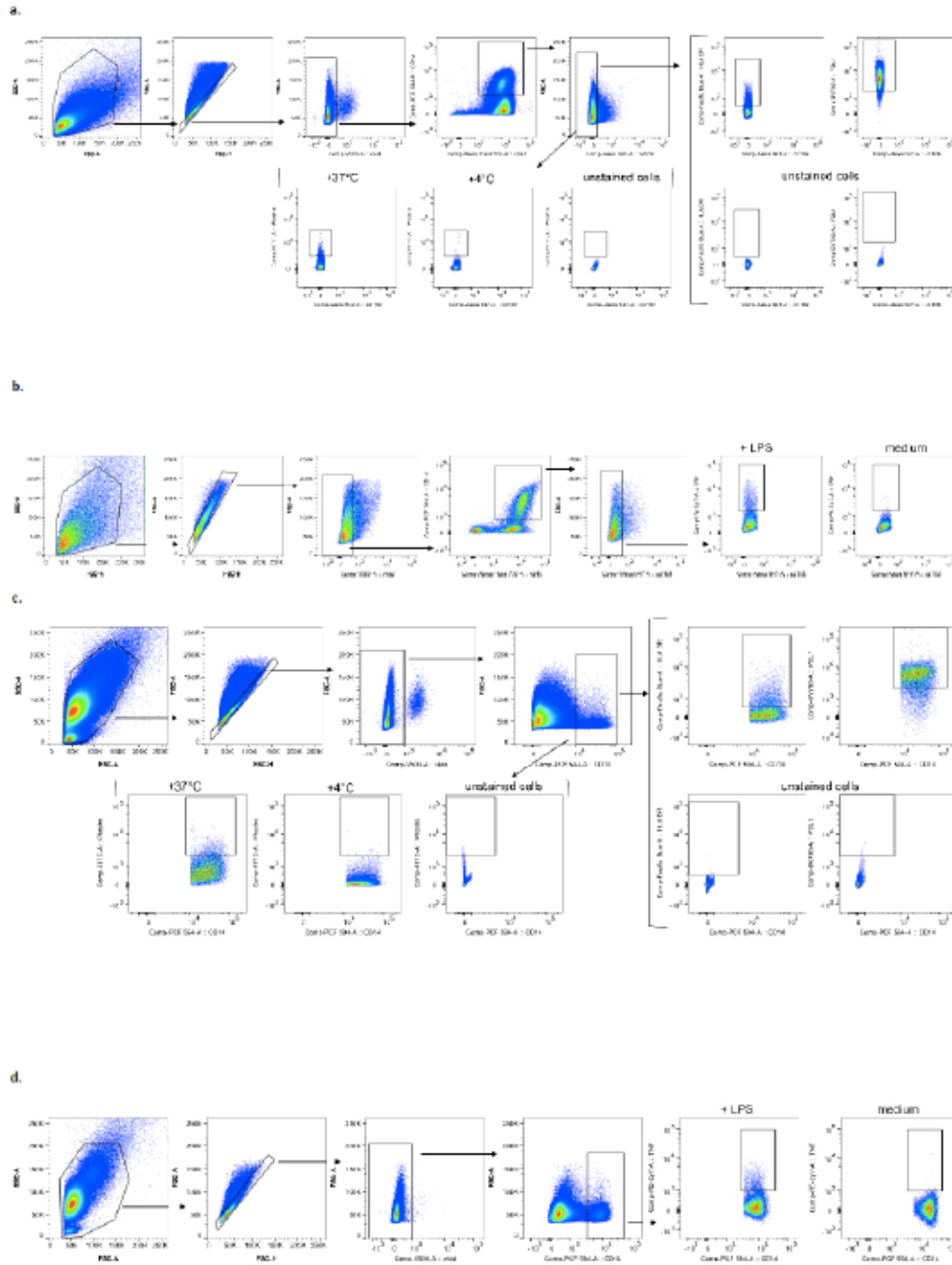


Figure S2. Phagocytosis of *E. coli* particles by alveolar monocytes according to their HLA-DR expression measured by flow cytometry. The phagocytosis activity of alveolar monocytes has been measured with and without (medium condition) LPS challenge, and expressed in percentage of positive cells (% a) and in mean fluorescence intensity (MFI, b), in ten pneumonia-related ARDS patients. Phagocytosis activity was analyzed by two-way ANOVA with repeated measures. When results were expressed in % (a), there was no significant effect of HLA-DR status (HLA-DR⁺ vs HLA-DR⁻, $p=0.2687$), nor a significant effect of experimental condition (medium vs LPS, $p=0.1228$), or a significant interaction (HLA-DR status x experimental condition, $p=0.7057$). When results were expressed in MFI (b), there was no significant effect of HLA-DR status (HLA-DR⁺ vs HLA-DR⁻, $p=0.0621$), nor a significant effect of experimental condition (medium vs LPS, $p=0.8041$), or a significant interaction (HLA-DR status x experimental condition, $p=0.9984$). Displayed p-values come from post-hoc comparisons performed using the Sidak test.

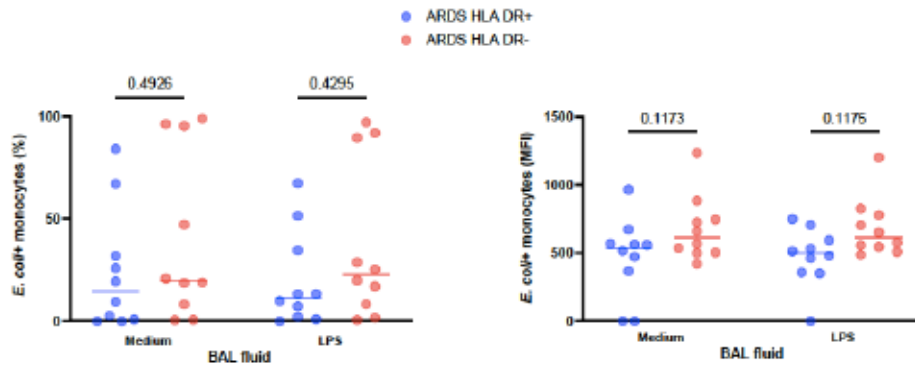


Figure S3. Alveolar monocytes intracellular TNF expression according to HLA-DR expression measured by flow cytometry. The intracellular TNF expression of alveolar monocytes was measured with and without (medium condition) LPS challenge and expressed in percentage of positive cells (% a) and in mean fluorescence intensity (MFI, b), in ten pneumonia-related ARDS. By two-way ANOVA with repeated measures, when results were expressed in % (a), there was no significant effect of HLA-DR status (HLA-DR⁺ vs HLA-DR⁻, $p=0.9500$), but a significant effect of experimental condition (medium vs LPS, $p=0.0029$), and no significant interaction (HLA-DR status x condition, $p=0.7458$). When results were expressed in MFI (b), there was no significant effect of HLA-DR status (HLA-DR⁺ vs HLA-DR⁻, $p=0.8459$) but a significant effect of experimental condition (medium vs LPS, $p=0.0076$), and no significant interaction (HLA-DR status x experimental condition, $p=0.3994$). Displayed p-values are significant at the <0.05 level. Horizontal bars represent median values.

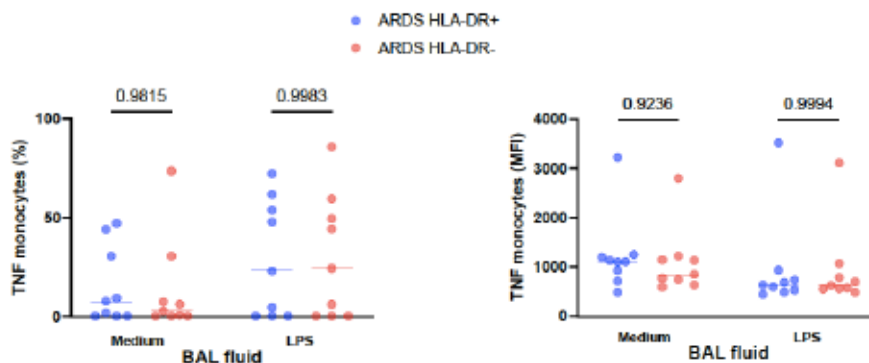


Table S1. Characteristics of non ARDS patients (n=7) included in the study

Variables	Non-ARDS patients*						
	1	2	3	4	5	6	7
Age	40	72	30	25	40	25	67
Gender	Male	Male	Male	Male	Female	Male	Male
Immunosuppression	No	No	No	No	No	No	No
Comorbidities	None	Prostate cancer (2005, in remission)	None	None	None	None	Ischemic heart disease, hypertension, COPD
Smoker	No	Yes	Yes	No	No	No	Yes
Clinical indication for bronchoscopy	Micronodules in RUL	Ground glass lesions in right upper lobe + nodular lesion	Suspicion of tuberculosis	Hilar adenopathy	Lung micronodules and positive IFN- γ release assay	Weight loss, hilar bilateral lymphadenopathy and interstitial abnormalities	Pulmonary isolated cysts in RLL in context of medical history of cerebral adenocarcinoma and smoking
Characteristics upon BAL sampling							
WBC counts, 10 ³ /mm ³	6.4	17.4	5.0	6.0	6.4	6	12.2
Neutrophils	3.5	14.4	2.4	3.7	3.5	3.7	9
Lymphocytes	2.4	2.2	1.5	1.3	2.4	1.3	1.3
Monocytes	0.4	0.3	0.6	0.8	0.4	0.7	0.7
BAL fluid cytology							
Leukocytes, 10 ³ /mL	77	70	197	130	77	130	143.3
Macrophages, %	87	84	66	66	87	66	29
Neutrophils, %	1	15	1	1	0	0.5	1
Lymphocytes, %	12	1	30	33	13	33	49

*All non ARDS patients were free of ARDS, active pulmonary infection, infiltrative lung disease, and immunosuppression; BAL, broncho-alveolar lavage; RLL, right lower lobe; RUL, right upper lobe; WBC, white blood cells

Table S2. Microbiological documentation of patients (n=10) with pneumonia-related ARDS

Bacteria	7 (70%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Haemophilus influenzae</i>	1*
<i>Enterobacteriaceae</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	2*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Virus	1 (10%)
<i>Influenza A or B</i>	0
<i>Adenovirus</i>	1
No documentation	2 (20%)

* Including three patients with bacterial co-infections

References

1. Meyer, K.C.; Raghu, G.; Baughman, R.P.; Brown, K.K.; Costabel, U.; du Bois, R.M.; Drent, M.; Haslam, P.L.; Kim, D.S.; Nagai, S.; et al. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2012, 185, 1004–1014, doi:10.1164/rccm.201202-0320ST.
2. Yu, Y.-R.A.; Hotten, D.F.; Malakhau, Y.; Volker, E.; Ghio, A.J.; Noble, P.W.; Kraft, M.; Hollingsworth, J.W.; Gunn, M.D.; Tighe, R.M. Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2016, 54, 13–24, doi:10.1165/rcmb.2015-0146OC.

4. Supplement en ligne article 4: Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome

Sophie Hue ; Asma Beldi-Ferchiou*, **Inès Bendib***, Mathieu Surenaud, Slim Fourati, Thomas Frapard, Simon Rivoal, Keyvan Razazi, Guillaume Carteaux, Marie-Hélène Delfau-Larue, Armand Mekontso-Dessap, Etienne Audureau, Nicolas de Prost.

Am J Respir Crit Care Med 2020; 202 (11):1509–1519.

***Contribution égale**

Uncontrolled innate and impaired adaptive immune responses are prognostic features of COVID-19 ARDS

Online supplement

Content

Methods	2
References.....	5
Results	6
Table E1.....	6
Table E2.....	7
Table E3.....	8
Table E4.....	9
Table E5.....	11
Figure E1.....	14
Figure E2.....	15
Figure E3.....	16
Figure E4.....	17
Figure E5.....	18

Methods

Non-COVID-19 ARDS patients

All patients with moderate/severe pneumonia-related ARDS were included consecutively with the following inclusion criteria: tracheal intubation and mechanical ventilation since less than 48 hours; pulmonary infection diagnosed less than 7 days before ICU admission ; bilateral pulmonary infiltrates on chest x-ray; a PaO₂/FiO₂ ratio \leq 200 mm Hg with a positive end-expiratory pressure (PEEP) \geq 5 cm H₂O. Non-inclusion criteria were as follows: age <18 years; pregnancy; chronic respiratory failure requiring long-term oxygen therapy; Child-Pugh C liver cirrhosis; lung fibrosis; immunosuppression (*i.e.*, HIV infection, active hematological malignancy or solid cancer receiving chemotherapy, corticosteroids therapy for more than 0.5 mg/kg/day since more than 4 weeks, organ transplant patients), SAPS II (Simplified Acute Physiology II score) $>$ 90, irreversible neurological disorders, patients with withholding/withdrawing of life-sustaining therapies and profound hypoxemia (PaO₂/FiO₂ $<$ 75 mm Hg). Seventy patients with non-COVID-19 ARDS were included during the study period, 36 of whom underwent at least two blood samples drawn at days 1-2 and days 4-6 time points, as depicted in the flow chart (Figure E1).

Study design and patients

ARDS patients received mechanical ventilation using a standardized protective ventilation strategy (1). Other treatments, including neuromuscular blocking agents, nitric oxide inhalation, prone positioning and venovenous extra-corporeal membrane oxygenation were administered depending on the severity of ARDS and according to National guidelines (2). The prevention of ventilator-associated pneumonia followed a multifaceted program (3). Sedation and mechanical ventilation weaning followed standardized protocols.

Data collection

Demographics, clinical and laboratory variables were recorded upon ICU admission, at samples collection time points and during ICU stay. Other recorded variables included the use of adjuvant therapies for ARDS, the need for hemodialysis or vasopressors, corticosteroids administration, and the number of organ failure-free days at day 28. The primary clinical endpoint of the study was day-28 mortality.

Flow cytometry analyses

Blood samples were collected within 48 hours of ICU admission (Days 1-2 sample) and 4 days thereafter (Days 4-6 sample) in EDTA tubes, shipped at room temperature and analyzed within

2 h. Immuno-staining was performed as follows: 100 μ L of whole blood was incubated for 10 min at RT in the dark with the different combinations of the following conjugated-monoclonal antibodies: anti-CD4-PE (clone 13B8.2), anti-CD3-AA750 (clone UCHT1), anti-CD8-AA700 (B9.11), anti-CD38-PC5.5 (LS198-4-3) or isotype control, anti-CD279 (PD-1)-PC7 (clone PD1) or isotype control, anti-HLA-DR-PB (Immu-357) or isotype control, anti-CD14-ECD (RMO52) and CD45-Krome Orange (clone J33) (all reagents were from Beckman Coulter). Red-blood-cells were then lysed using VersaLyse Solution (Beckman Coulter) according to the manufacturer's instructions. Washed samples were immediately acquired on a 10-multicolor Navios flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed with the Kaluza 2.1 software (Beckman Coulter).

Independent T and B cell counts were performed using standardized procedures. For non COVID-19 patients, absolute cell counts were performed using FC500 cytometer (Beckman Coulter) and a routine bead-based single platform technology according to the manufacturer instructions (All reagents and materials were from Beckman Coulter). For COVID-19 patients, T and B cell counts were performed using a fully automated AQUIOS cytometer. Of note, the two lymphocytes counts methods have an excellent correlation and agreement.

Monocytes, and lymphocytes were first gated on a side scatter-area (SSC-A) versus CD45 (the leukocyte common antigen) flow cytometry dot plots. Monocytes were defined as Side Scatter (SS) intermediate, CD45+ and CD14+ cells (Figure E2). Expression of HLA-DR was then analyzed (Figure E2, upper panel). T CD8+ lymphocytes were identified as CD45+ CD3+ CD8+ cells within the CD45+ SS low lymphocyte gate. Expression of HLA-DR, CD38 and PD-1 was then analyzed on T CD8+ lymphocytes (Figure E2, lower panel).

Measurements of serum cytokine concentrations

Blood samples collected at days 1-2, days 4-6 and days 8-12 for patients who still had ARDS criteria were immediately centrifuged for storage at -80°C . Cytokines were measured at distance in serum inactivated for 20 minutes at 56°C using Luminex[®] multiplex bead-based technology (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and a Bio-Plex 200[®] instrument (BioRad, Hercules, CA, USA), according to the manufacturers' protocols on serum diluted to 1/2. Laboratory technician who performed the assays was blinded to all clinical data. The following cytokines/chemokines were evaluated CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL19/MIP-3 β , CD40L, CXCL10/IP-10, FGF-basic, G-CSF, GRZ-B, IFN- β , IL-1 α , IL-1ra, IL-3, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13, IL-17A, PD-L1, TNF- α , VEGF, CCL3/MIP-1 α , CCL11/Eotaxin, CCL20/MIP-3 α , CX3CL1/Fractalkine, EGF, Flt-3L, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-

8/CXCL8, IL-12p70, IL-15, IL-33, TGF- α , TRAIL, CCL5/RANTES, IL-17E/IL-25. All samples, including those obtained from both COVID-19 and non-COVID-19 patients, were inactivated during 20 minutes at 56°C, as previously described (4). We analyzed cytokines/chemokines which displayed more than 80% of concentration values above the lower limit of quantification (n=19). For each of these analytes, extrapolated concentration values calculated by Bioplex Manager 6.1 software were taken into account and undetectable values were imputed to the lowest extrapolated concentration value.

Statistical analyses

Descriptive results are presented as means (\pm standard deviation [SD]) or medians (1st-3rd quartiles) for continuous variables, and as numbers with percentages for categorical variables. Log-transformation was applied to non-normally distributed variables, as assessed by graphical methods and the Shapiro-Wilk test. Boxplots were plotted to illustrate differences in cytokines levels according to time and COVID-19 status.

Bivariate correlation analyses between cytokines and COVID-19 status were conducted by computing Spearman and biserial correlation coefficients for continuous-continuous and binary-continuous variables correlations, respectively. A correlation network plot was built from those results to graphically illustrate relationships.

Unadjusted between-groups comparisons between conditions (COVID-19 *versus* non-COVID-19) and outcome (alive *versus* dead at ICU day-28) were performed using Mann-Whitney tests for continuous variables, and Chi² or Fisher's exact tests for categorical variables, as appropriate. Within-groups comparisons between baseline and subsequent assessments were conducted using paired Wilcoxon signed ranks test. Association between cytokines, other covariates and final outcome were further assessed after systematically adjusting for age and SOFA score, using logistic regression (categorical variables) and linear regression modeling (continuous variables) to compute adjusted odds ratios (95% confidence interval) and adjusted means (\pm standard error), respectively.

Longitudinal analyses were finally performed to assess the temporal evolution of cytokines levels over a 12-day period using mixed effects linear regression models to account for the correlation between repeated data over time. Models included a COVID-19 status variable, a time variable and an interaction term COVID-19*time to test for differences in average cytokines levels between COVID-19 and non-COVID-19 patients, significant positive or negative trends over time (slopes), and differentiated trends over time between COVID-19 and ARDS patients.

Two-tailed p-values < 0.05 were considered statistically significant, applying Benjamini-Hochberg correction for test multiplicity in correlation analyses. Analyses were performed using Stata V16.0 statistical software (StataCorp, College Station, TX, USA), R 3.6.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; *corrplot* and *qgraph* packages) and GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

References

1. Mercat A, Richard J-CM, Vielle B, Jaber S, Osman D, Diehl J-L, Lefrant J-Y, Prat G, Richecoeur J, Nieszkowska A, Gervais C, Baudot J, Bouadma L, Brochard L, Expiratory Pressure (Express) Study Group. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008;299:646–655.
2. Papazian L, Aubron C, Brochard L, Chiche J-D, Combes A, Dreyfuss D, Forel J-M, Guérin C, Jaber S, Mekontso-Dessap A, Mercat A, Richard J-C, Roux D, Vieillard-Baron A, Faure H. Formal guidelines: management of acute respiratory distress syndrome. *Ann Intensive Care* 2019;9:69.
3. Bouadma L, Mourvillier B, Deiler V, Le Corre B, Lolom I, Régnier B, Wolff M, Lucet J-C. A multifaceted program to prevent ventilator-associated pneumonia: impact on compliance with preventive measures. *Crit Care Med* 2010;38:789–796.
4. Darnell MER, Taylor DR. Evaluation of inactivation methods for severe acute respiratory syndrome coronavirus in noncellular blood products. *Transfusion* 2006;46:1770–1777.

Results

Table E1. Results from longitudinal analysis by mixed effects linear regression model assessing the association between COVID-19 status, time elapsed since hospital admission and serum cytokines concentrations

	COVID-19 status ^a	Time ^b	Interaction (COVID-19 status x time) ^c
IL-6 (log)	0,093	<0.0001	0,218
IL-1ra/IL-1F3 (log)	0,432	<0.0001	0,267
IL-8/CXCL8 (log)	0,045	0,337	0,111
IL-10	<0.0001	0,005	0,004
CXCL10/IP-10	0,082	0,001	0,201
GM-CSF	0,001	0,001	0,045
CCL2/MCP-1 (log)	0,068	0,007	0,924
CCL3/MIP-1a (log)	0,007	0,707	0,985
CCL4/MIP-1b (log)	0,615	0,103	0,266
CCL19/MIP-3b (log)	0,141	0,039	0,149
CCL5/RANTES	0,033	0,766	0,688
CCL20/MIP-3a (log)	0,002	0,176	0,003
EGF	<0.0001	0,794	0,289
CX3CL1/Fractalkine (log)	0,677	0,693	0,571
VEGF (log)	0,625	0,877	0,019
Flt3 (log)	0,756	0,218	0,397
IL-15 (log)	0,022	<0.0001	0,031
IL-7 (log)	0,169	0,798	0,241

Results are p-values from mixed effects linear regression model, testing for ^a differences in average cytokines levels between COVID-19+ and ARDS patients, ^b significant positive or negative trends over time (slopes), and ^c differentiated trends over time between COVID-19 and ARDS patients.

Table E2. Results from longitudinal analysis by mixed effects linear regression model assessing the association between COVID-19 status, time elapsed since first symptoms of disease onset (COVID-19 or non-COVID-19) and serum cytokines concentrations.

	COVID-19 status ^a	Time ^b	Interaction (COVID-19 status x time) ^c
IL-6 (log)	0,183	0,001	0,265
IL-1ra/IL-1F3 (log)	0,665	0,002	0,440
IL-8/CXCL8 (log)	0,082	0,243	0,122
IL-10	<0.0001	0,264	<0.0001
CXCL10/IP-10	0,002	0,098	0,010
GM-CSF	<0.0001	0,155	0,002
CCL2/MCP-1 (log)	0,065	0,061	0,809
CCL3/MIP-1a (log)	0,028	0,116	0,777
CCL4/MIP-1b (log)	0,195	0,281	0,983
CCL19/MIP-3b (log)	0,720	0,824	0,919
CCL5/RANTES	0,089	0,926	0,817
CCL20/MIP-3a (log)	0,002	0,101	0,003
EGF	<0.0001	0,381	0,689
CX3CL1/Fractalkine (log)	0,932	0,931	0,965
VEGF (log)	0,253	0,419	0,015
Flt3 (log)	0,910	0,177	0,335
IL-15 (log)	0,060	<0.0001	0,075
IL-7 (log)	0,058	0,835	0,079

Results are p-values from mixed effects linear regression model, testing for ^a differences in average cytokines levels between COVID-19+ and ARDS patients, ^b significant positive or negative trends over time (slopes), and ^c differentiated trends over time between COVID-19 and ARDS patients.

Table E3. Serum cytokines concentrations according to the microbiological etiology of acute respiratory distress syndrome (non-COVID-19 viral or bacterial/non-documented (ND) or COVID-19).

Serum cytokines concentrations (pg/mL)	Non-COVID-19 (n=31)*		COVID-19 (n=35) ^b	Global p-value ^c	P-value for Post-hoc comparisons ^b		
	Viral (n=10)	Bacterial/ND (n=21)			Viral vs bacterial	Viral vs COVID-19	Bacterial vs COVID-19
IL-6	298.4 [41.1-8796.1]	165.6 [87.8-430.6]	171.4 [81.2-333.5]	0,682			
IL-1- α /IL-1F3	314.8 [119.9-764.4]	184.8 [113.6-320.9]	172.6 [134.4-336.6]	0,734			
IL-8/CXCL8	106.4 [60.6-147.2]	52.2 [40.8-97.4]	117.6 [68.0-398.2]	0,010	0,661	>0.99	0,006
IL-10	451.4 [219.6-595.4]	99.3 [59.4-201.1]	456.7 [348.8-534.7]	<0.001	0,045	>0.99	<0.001
CXCL10/IP-10	2214.9 [362.3-4048.5]	188.4 [101.3-450.8]	1911.3 [919.1-2555.6]	<0.001	0,016	>0.99	<0.001
GM-CSF	206.7 [83.9-299.7]	44.2 [21.7-74.4]	209.4 [158.4-233.8]	<0.001	0,045	>0.99	<0.001
CCL2/MCP-1	624.6 [406.8-3289.2]	649.7 [400.1-1145.1]	1473.4 [897.5-2798.0]	0,012	>0.99	0,202	0,016
CCL3/MIP-1a	17.3 [9.4-61.3]	22.5 [19.1-38.7]	53.5 [22.5-116.0]	0,007	>0.99	0,070	0,018
CCL4/MIP-1b	233.6 [142.5-397.8]	229.1 [112.6-278.1]	246.5 [179.2-397.8]	0,368			
CCL19/MIP-3b	195.8 [124.6-1089.0]	140.6 [99.8-206.7]	117.7 [78.2-213.6]	0,154			
CCL5/RANTES	27348.3 [21191.6-47176.3]	30490.5 [19437.4-45335.9]	45900.9 [29541.2-60859.8]	0,030	>0.99	0,122	0,082
CCL20/MIP-3a	17.2 [7.6-75.5]	19.9 [8.0-66.0]	9.2 [4.2-20.3]	0,043	>0.99	0,235	0,082
EGF	87.9 [50.8-158.2]	127.6 [71.1-244.8]	433.0 [290.1-604.0]	<0.001	0,549	<0.001	<0.001
CX3CL1/Fractalkine	1537.3 [1267.1-1948.8]	1156.6 [562.6-1386.9]	880.0 [783.1-1377.4]	0,075			
VEGF	1014.2 [712.0-1422.2]	882.9 [583.8-1602.8]	920.4 [628.6-1508.1]	0,962			
Fit-3L	101.7 [60.0-150.7]	98.7 [73.5-134.9]	112.2 [81.2-168.4]	0,624			
IL-15	6.9 [3.4-13.0]	5.7 [3.5-9.3]	5.0 [3.6-7.6]	0,440			
IL-7	16.3 [9.7-22.5]	13.4 [7.0-22.8]	13.4 [8.4-23.0]	0,778			

Results are presented as median (1st-3rd quartiles); **bolded** results are statistically significant at the p<0.05 level; ^a Missing data, n=5; ^b Missing data, n=3; ^c p-values come from the Kruskal-Wallis test; ^b Post-hoc comparisons were performed when the global p-value was <0.05 and corrected for multiple testing using the Bonferroni correction.

Table E4. Clinical and biological variables associated with day-28 mortality in COVID-19 patients and non-COVID-19 patients

	COVID-19 (n=38)		p-value ^a	Non-COVID-19 (n=36)		p-value ^a
	Alive N=25	Dead N=13		Alive N=32	Dead N=4	
Serum cytokines concentrations (pg/mL)^b						
IL-6	129.2 [77.7-239.2]	219.9 [174.8-377.0]	0,070	161.2 [84.3-534.7]	457.1 [86.6-492.1]	0,738
IL-1- α /IL-1F3	160.4 [124.9-275.3]	278.1 [142.0-685.5]	0,126	186.9 [112.4-418.9]	321.9 [142.6-443.6]	0,462
IL-8/CXCL8	155.0 [67.7-431.8]	111.6 [73.0-136.5]	0,303	58.1 [40.8-144.9]	97.4 [17.2-136.1]	0,789
IL-10	429.7 [304.6-493.3]	517.7 [473.8-580.8]	0,013	167.1 [84.5-549.3]	87.5 [8.4-138.7]	0,192
CXCL10/IP-10	1461.6 [793.9-2103.8]	2555.6 [1758.9-3284.1]	0,017	294.4 [153.4-3314.5]	166.8 [65.4-306.9]	0,229
GM-CSF	196.1 [146.4-220.6]	233.8 [213.5-272.3]	0,005	70.1 [34.1-259.1]	40.2 [4.4-54.5]	0,181
CCL2/MCP-1	1442.7 [876.0-2471.4]	2034.0 [1019.7-4020.7]	0,500	699.3 [403.5-1465.6]	500.2 [320.3-2720.8]	0,548
CCL3/MIP-1a	57.6 [22.5-149.0]	31.8 [21.0-84.7]	0,394	22.5 [13.8-43.6]	15.4 [9.4-38.7]	0,482
CCL4/MIP-1b	246.0 [184.7-379.0]	246.5 [179.2-469.5]	0,957	231.3 [142.5-298.0]	66.4 [6.4-316.6]	0,181
CCL19/MIP-3b	110.1 [77.7-159.3]	213.6 [102.1-402.5]	0,065	146.2 [112.1-267.2]	102.1 [63.5-719.6]	0,504
CCL5/RANTES	45606.7 [31139.0-69829.2]	45900.9 [28297.0-53720.2]	0,477	29748.1 [21068.9-46256.1]	7170.3 [1302.6-50869.9]	0,181
CCL20/MIP-3a	7.6 [4.0-13.5]	17.5 [6.4-28.5]	0,076	19.0 [7.9-82.8]	16.2 [5.9-66.0]	0,640
EGF	492.7 [324.3-619.6]	324.2 [240.6-433.0]	0,033	120.1 [70.1-188.9]	15.5 [1.5-325.1]	0,333
CX3CL1/Fractalkine	835.6 [718.6-1075.9]	1193.4 [950.9-1748.0]	0,028	1294.7 [617.1-1663.8]	935.4 [750.2-2576.9]	0,894
VEGF	874.2 [619.5-1363.4]	1361.4 [860.5-1668.6]	0,177	875.7 [659.7-1586.4]	1116.9 [373.0-1981.2]	0,947
Fit-3L	110.6 [76.6-166.7]	112.8 [103.8-170.4]	0,570	97.5 [70.6-139.0]	136.9 [97.4-277.2]	0,181
IL-15	4.5 [3.5-6.7]	6.9 [4.5-10.0]	0,126	6.0 [3.5-9.7]	6.8 [3.4-13.4]	0,815
IL-7	13.1 [8.1-24.2]	13.5 [9.3-23.0]	0,915	15.5 [9.3-23.4]	5.2 [2.5-22.8]	0,216
Other laboratory features						
RT-qPCR viral load, CT ^c	32.0 [29.5-35.0]	26.0 [20.7-28.6]	<0.001	-	-	-
T CD4 ⁺ lymphocytes, /mm ³	308.0 [229.0-380.0]	212.0 [152.0-281.0]	0,186	335.0 [190.0-526.5]	457.5 [159.5-704.0]	0,940
T CD8 ⁺ lymphocytes, /mm ³	111.0 [88.0-153.0]	142.0 [99.0-171.0]	0,469	179.0 [68.5-399.5]	211.5 [48.0-361.5]	0,669
B lymphocytes, /mm ³	435.0 [322.0-537.0]	323.0 [296.0-443.0]	0,364	199.5 [105.0-326.0]	217.0 [114.0-326.5]	0,880
NK cells, /mm ³	47.0 [31.0-76.0]	51.0 [28.0-85.0]	0,735	-	-	-
T CD4 ⁺ PD1 ⁺ lymphocytes, %	20.4 [16.5-26.4]	23.6 [19.1-30.0]	0,317	24.9 [17.8-37.6]	28.1 [16.9-38.5]	0,836
T CD8 ⁺ PD1 ⁺ lymphocytes, %	25.8 [16.5-42.8]	26.1 [14.7-39.8]	0,470	42.5 [26.3-50.8]	34.7 [19.7-50.6]	0,632
T CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ lymphocytes, %	9.8 [8.5-18.7]	8.9 [8.1-20.2]	0,854	12.4 [4.9-18.6]	9.0 [6.4-20.4]	0,821
HLA-DR ⁺ monocytes, %	68.3 [49.8-79.4]	81.4 [44.3-82.4]	0,508	28.5 [19.0-43.3]	40.3 [24.6-65.0]	0,406

Results are presented as median (1st-3rd quartiles); **bolded** results are statistically significant at the p<0.05 level; ^a P-values comes from the Mann-Whitney test; ^b Missing data, n=3 for COVID-19 patients and n=5 for non-COVID-19 patients; ^c obtained from naso-pharyngeal swabs

Table E5. Clinical and biological variables associated with day-28 mortality in COVID-19 patients (n=38)*

	Unadjusted analysis			Adjusted analysis*		
	Alive N=25	Dead N=13	p-value	Alive N=25	Dead N=13	p-value
Clinical features (categorical variables)						
	N (%)	N (%)		Adjusted odds ratios (95% CI)		
Male gender	22 (88%)	10 (77%)	0,392	0.28 (0.03;2.94)		
Diabete	4 (16%)	8 (61%)	0,009	4.10 (0.67;25.00)		
COPD	1 (4%)	4 (31%)	0,038	1.41 (0.09;21.49)		
Chronic heart failure	1 (4%)	5 (38%)	0,012	13.12 (0.41;424.00)		
Obesity	9 (36%)	5 (38%)	1,000	3.03 (0.39;23.59)		
Smoker	9 (36%)	6 (46%)	0,728	0.64 (0.11;3.73)		
ARDS severity (Berlin definition)			0,904			
Mild	6 (24%)	2 (15%)		1(ref)		
Moderate	11 (44%)	7 (54%)		3.75 (0.31;45.39)		
Severe	8 (32%)	4 (31%)		2.62 (0.22;30.97)		
Clinical and general laboratory features (continuous variables)						
	Mean (±SD)	Mean (±SD)		Adjusted mean (±SE)	Adjusted mean (±SE)	p-value
ICU admission – Intubation, days	2.38 (±5.95)	1.23 (±2.24)	0,578	2.36 (±1.12)	1.26 (±1.61)	0,606
Age, years	57.04 (±12.43)	68.15 (±10.37)	0,007	56.93 (±2.53)	68.36 (±3.55)	0,017
BMI, kg/cm ²	28.83 (±5.18)	29.82 (±5.01)	0,589	28.33 (±1.04)	30.76 (±1.49)	0,225
Temperature, °C	38.58 (±1.01)	38.42 (±1.11)	0,987	38.58 (±0.23)	38.42 (±0.33)	0,723
SOFA	7.0 (±2.8)	9.8 (±2.6)	0,017	7.1 (±0.6)	9.9 (±0.8)	0,013
SAPS II	39.4 (±13.2)	53.5 (±25.1)	0,054	45.6 (±3.0)	42.3 (±4.5)	0,579
PaO ₂ /FIO ₂ ratio, mmHg	121.2 (±58.6)	361.3 (±761.0)	0,036	128.8 (±101.1)	356.0 (±145.2)	0,243
pH	7.41 (±0.07)	7.36 (±0.11)	0,206	7.39 (±0.02)	7.38 (±0.03)	0,840
PaCO ₂ , mm Hg	43.4 (±11.2)	43.5 (±10.1)	0,963	42.1 (±1.9)	43.0 (±2.8)	0,815
Arterial blood lactates, mM	1.5 (±0.5)	1.5 (±0.5)	0,823	1.5 (±0.1)	1.5 (±0.2)	0,781
Creatinine, µmol/L	85.6 (±34.6)	210.4 (±287.4)	0,093	94.6 (±38.3)	191.3 (±55.0)	0,191
Bilirubin, µmol/L	12.3 (±9.2)	13.7 (±21.5)	0,345	14.8 (±3.0)	8.7 (±4.2)	0,281
Prothrombin time, %	77.8 (±19.0)	80.0 (±10.3)	0,644	77.5 (±3.8)	81.6 (±5.3)	0,575
WBC counts, 10 ³ /mm ³	7.72 (±2.52)	7.55 (±4.04)	0,302	7.79 (±0.70)	7.24 (±1.01)	0,684
Lymphocytes, 10 ³ /mm ³	0.72 (±0.32)	0.67 (±0.30)	0,598	0.71 (±0.07)	0.70 (±0.10)	0,924
Monocytes, 10 ³ /mm ³	0.38 (±0.22)	0.37 (±0.30)	0,389	0.39 (±0.06)	0.35 (±0.08)	0,670
Neutrophils, 10 ³ /mm ³	6.39 (±2.51)	6.39 (±3.52)	0,460	6.37 (±0.65)	6.22 (±0.94)	0,907
Neutrophils-to-lymphocytes ratio	10.66 (±6.54)	12.52 (±9.73)	0,794	10.76 (±1.75)	11.98 (±2.51)	0,714
Serum cytokines concentrations (pg/mL)						
IL-6 (LOG)	4.91 (±1.00)	5.55 (±0.75)	0,070	4.99 (±0.20)	5.56 (±0.31)	0,168
IL-1-ra/IL-1F3 (LOG)	5.20 (±0.77)	5.74 (±0.81)	0,126	5.37 (±0.16)	5.52 (±0.24)	0,633
IL-8/CXCL8 (LOG)	5.25 (±1.20)	4.79 (±1.16)	0,303	5.42 (±0.26)	4.45 (±0.41)	0,073
IL-10	397.08 (±133.07)	503.68 (±116.54)	0,013	399.90 (±29.86)	502.18 (±46.03)	0,093
CXCL10/IP-10	1563.28 (±878.86)	2542.21 (±1025.40)	0,017	1613.27 (±213.95)	2487.20 (±329.87)	0,047
GM-CSF	179.12 (±60.60)	232.80 (±52.93)	0,005	179.08 (±13.63)	234.18 (±21.01)	0,050
CCL2/MCP-1 (LOG)	7.29 (±0.72)	7.51 (±0.81)	0,500	7.44 (±0.16)	7.24 (±0.25)	0,528
CCL3/MIP-1a (LOG)	4.10 (±1.16)	3.76 (±1.00)	0,394	4.17 (±0.24)	3.49 (±0.38)	0,170
CCL4/MIP-1b (LOG)	5.53 (±0.62)	5.56 (±0.53)	0,957	5.51 (±0.13)	5.52 (±0.21)	0,987
CCL19/MIP-3b (LOG)	4.72 (±0.59)	5.22 (±0.93)	0,065	4.83 (±0.15)	5.10 (±0.23)	0,381
CCL5/RANTES	54108.66 (±34724.68)	44143.23 (±20631.97)	0,477	57323.60 (±7103.50)	38981.52 (±10952.62)	0,201
CCL20/MIP-3a (LOG)	2.04 (±0.89)	2.69 (±1.09)	0,076	2.14 (±0.20)	2.45 (±0.30)	0,429
EGF	479.45 (±221.60)	336.62 (±129.05)	0,033	477.57 (±44.41)	363.71 (±68.48)	0,204
CX3CL1/Fractalkine (LOG)	6.80 (±0.41)	7.14 (±0.52)	0,028	6.86 (±0.10)	7.03 (±0.16)	0,384
VEGF (LOG)	6.75 (±0.60)	7.10 (±0.71)	0,177	6.85 (±0.13)	7.03 (±0.21)	0,492
Flt-3L (LOG)	4.71 (±0.53)	4.79 (±0.35)	0,570	4.82 (±0.10)	4.62 (±0.15)	0,328
IL-15 (LOG)	1.49 (±0.63)	1.72 (±0.74)	0,126	1.51 (±0.15)	1.68 (±0.23)	0,556
IL-7 (LOG)	2.64 (±0.75)	2.67 (±0.79)	0,915	2.64 (±0.16)	2.73 (±0.25)	0,798
Other laboratory features						
RT-qPCR viral load ^b , cycle threshold	31.68 (±4.70)	25.27 (±5.23)	0,002	31.31 (±1.09)	25.71 (±1.56)	0,010
T CD4+ lymphocytes, /mm ³	315.44 (±161.20)	258.00 (±160.72)	0,186	324.17 (±35.58)	242.45 (±51.12)	0,233
T CD8+ lymphocytes, /mm ³ (LOG)	4.73 (±0.41)	4.90 (±0.52)	0,469	4.76 (±0.09)	4.84 (±0.13)	0,636
B lymphocytes, /mm ³	439.36 (±191.64)	419.69 (±251.42)	0,364	448.93 (±46.07)	403.05 (±66.19)	0,602
NK cells, /mm ³ (LOG)	3.93 (±0.62)	4.00 (±0.77)	0,735	3.91 (±0.15)	4.10 (±0.21)	0,521
T CD4+ PD1+ lymphocytes, % (LOG)	3.02 (±0.34)	3.17 (±0.49)	0,317	3.02 (±0.09)	3.13 (±0.12)	0,486
T CD8+ PD1+ lymphocytes, % (LOG)	3.25 (±0.49)	3.06 (±0.67)	0,470	3.30 (±0.12)	2.93 (±0.17)	0,099
T CD8+ HLA-DR+ CD38+ lymphocytes, % (LOG)	2.47 (±0.62)	2.44 (±0.78)	0,854	2.56 (±0.15)	2.29 (±0.21)	0,338
HLA-DR+ monocytes, % (LOG)	64.04 (±19.64)	64.54 (±28.41)	0,508	65.87 (±5.15)	63.27 (±7.40)	0,792

Results are presented as median (1st-3rd quartiles) or mean±standard deviation (SD) or ±standard error (SE), as appropriate; **bolded** results are statistically significant at the p<0.05 level; *Results from linear regression modeling (continuous variables) or logistic regression modeling adjusting for age and SOFA score; ^bobtained from naso-pharyngeal swabs

Figure E1.

Flow chart of patients with non-COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS) included between January 2014 and December 2018. CRD: chronic respiratory disease; LTO: long-term oxygenotherapy; OTI: oro-tracheal intubation; WH/WD of LST: withholding/withdrawal of life-sustaining therapies.

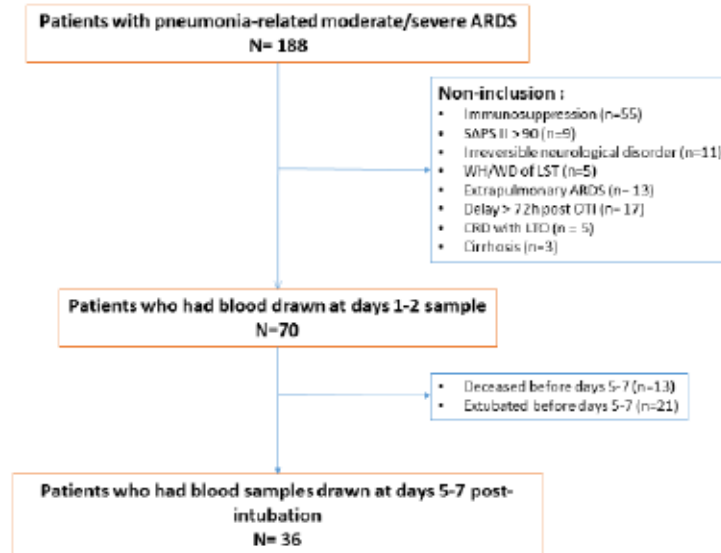


Figure E2.

Flow cytometry gating strategies. Monocytes, and lymphocytes were first gated on a side scatter-area (SSC-A) versus CD45 (the leukocyte common antigen) flow cytometry dot plots. Monocytes were defined as Side Scatter (SS) intermediate, CD45+ and CD14+ cells (Figure E2). Expression of HLA-DR was then analyzed (upper panel). T CD8+ lymphocytes were identified as CD45+ CD3+ CD8+ cells within the CD45+ SS low lymphocyte gate. Expression of HLA-DR, CD38 and PD-1 was then analyzed on T CD8+ lymphocytes (lower panel).

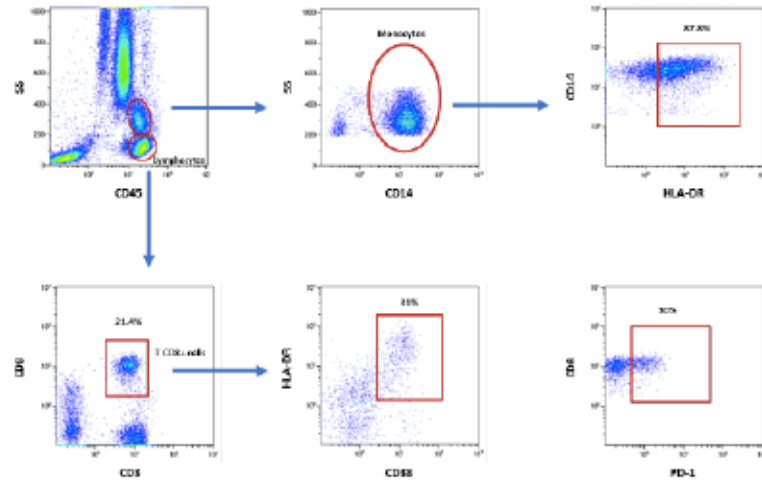


Figure E3.

Flow cytometry analysis of lymphocytes subsets and monocytes in COVID-19 (sky blue) and non-COVID-19 patients with viral (red) or bacterial/non-documented (ND) acute respiratory distress syndrome at days 1-2 of intensive care unit admission. A) Blood T CD4+ lymphocytes counts; There was no significant effect of ARDS group by the Kruskal-Wallis test ($p=0.454$); B) Blood T CD8+ lymphocytes counts; There was a significant effect of ARDS group by the Kruskal-Wallis test ($p=0.021$) but no significant between group differences on *post-hoc* comparisons; C) Blood B (CD19+) lymphocytes counts; There was a significant effect of ARDS group by the Kruskal-Wallis test ($p=0.007$) and a significant between group (viral vs COVID-19) difference on *post-hoc* comparisons (p -value comes from the Dunn's test); D) Percentage of T CD8+ CD38+ HLA-DR+ lymphocytes; There was no significant effect of ARDS group by the Kruskal-Wallis test ($p=0.850$); E) Percentage of T CD8+ PD1+ lymphocytes; There was a significant effect of ARDS group by the Kruskal-Wallis test ($p=0.004$) and a significant between group (viral vs COVID-19) difference on *post-hoc* comparisons (p -value comes from the Dunn's test); F) Percentage of HLA-DR+ monocytes; There was a significant effect of ARDS group by the Kruskal-Wallis test ($p<0.0001$) and a significant between group (viral vs bacterial/ND and bacterial/ND vs COVID-19) difference on *post-hoc* comparisons (p -value comes from the Dunn's test); Horizontal lines indicate the median value and the 1st and 3rd tertiles.

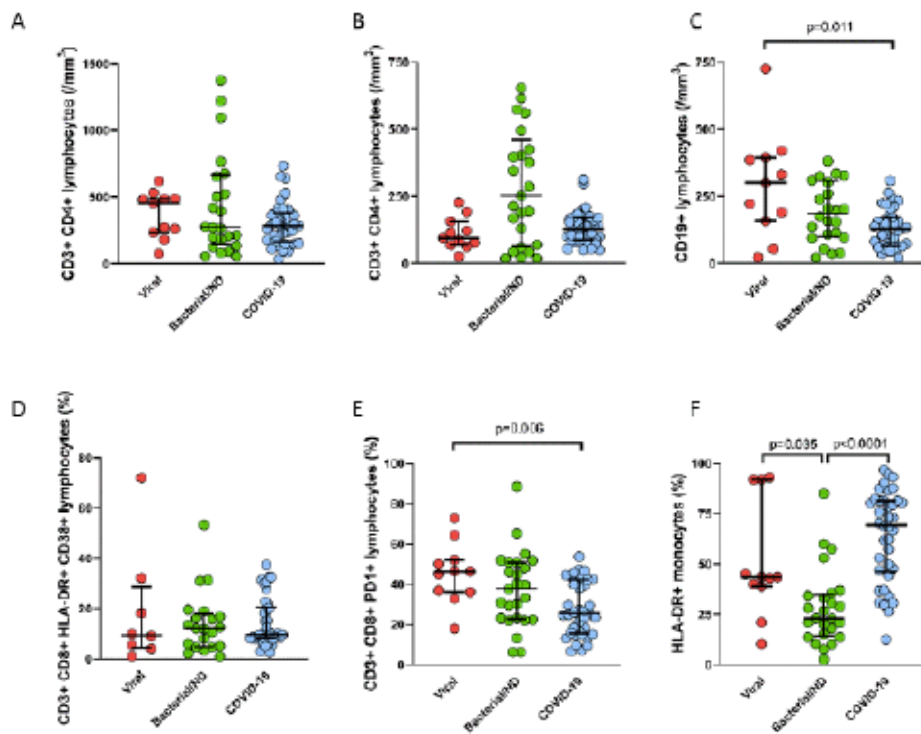


Figure E4.

Evolution of serum concentrations of cytokines over time in patients with COVID-19 (thick red lines) and non-COVID-19 (thick blue lines) acute respiratory distress syndrome. The y-axis represents serum concentrations expressed in (log) ng/mL. Individual trajectories of COVID-19 (thin red lines) and non-COVID-19 (thin blue lines) patients are represented in the background; The x-axis represents the time elapsed since symptoms onset.

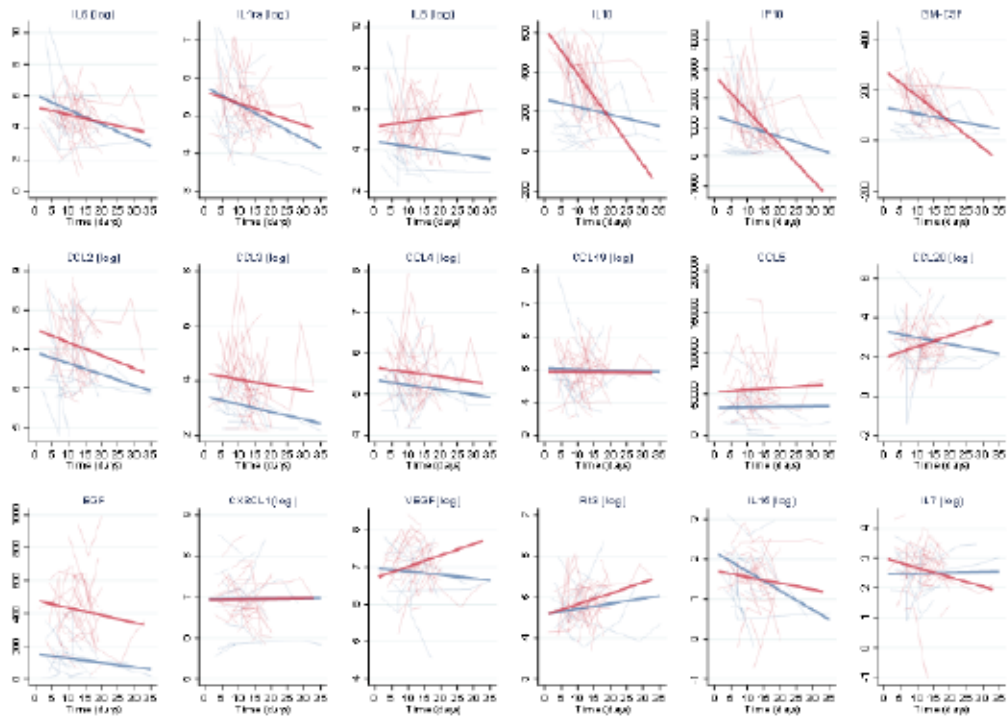
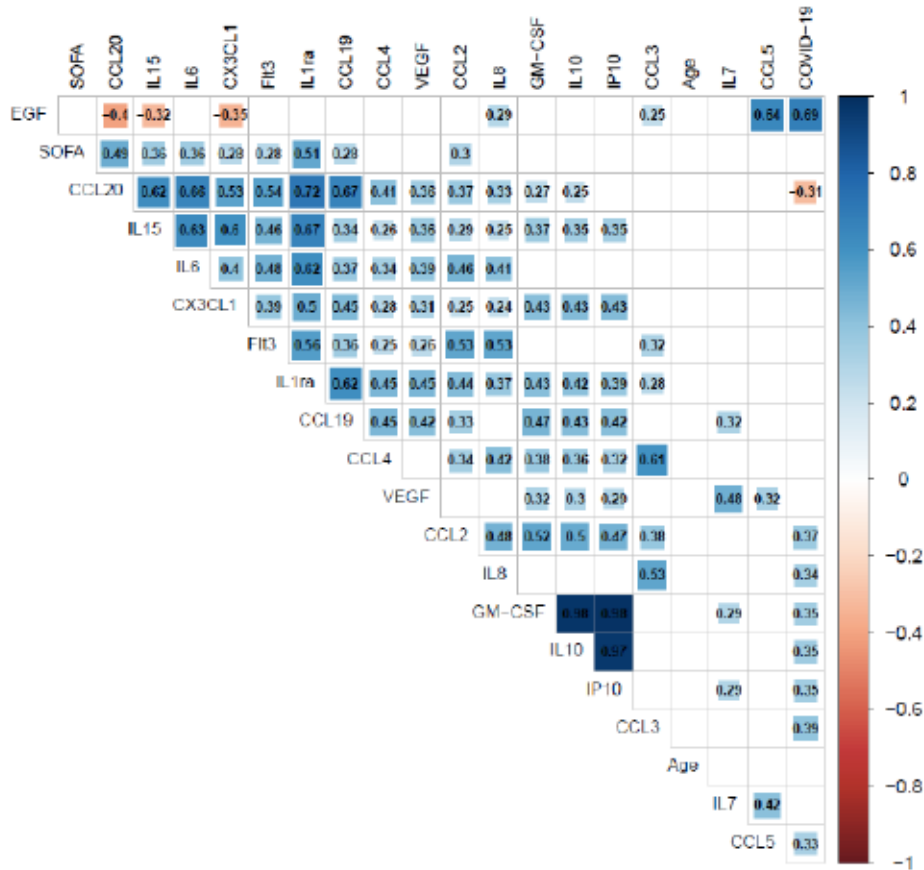


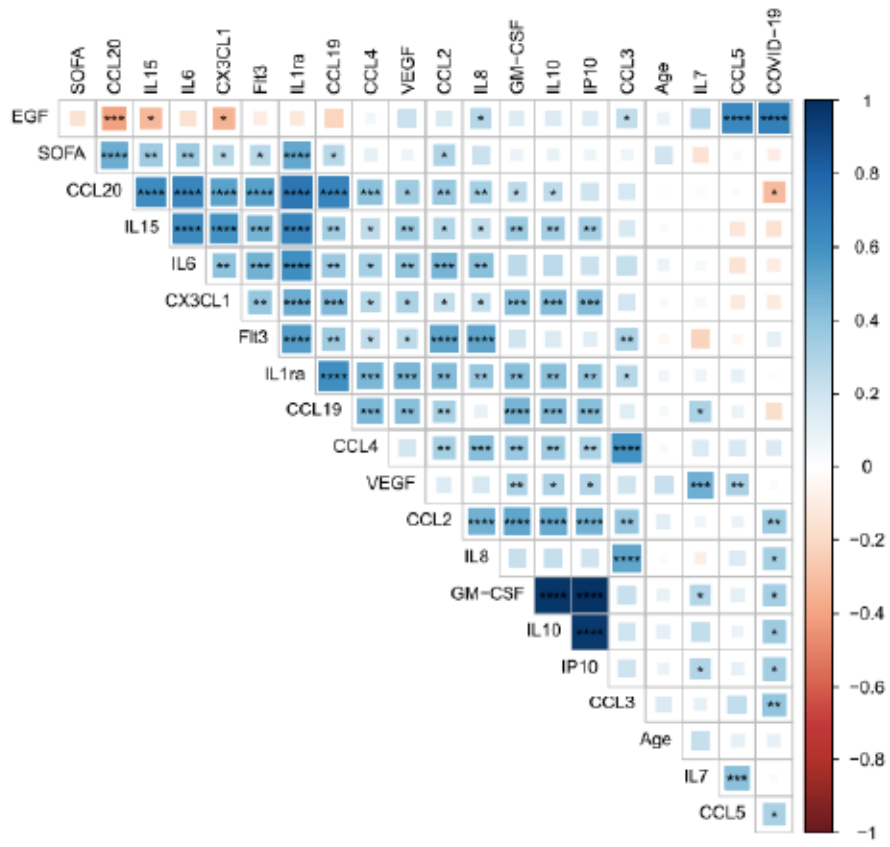
Figure E5.

Correlation matrix of serum cytokines concentrations, age and SOFA score in patients with COVID-19 (n=38) and non-COVID-19 (n=36) ARDS. A) Spearman and biserial correlation coefficients are provided for continuous-continuous and binary-continuous variables correlations, respectively, with positive (blue) and negative (red) correlation coefficients indicating statistical significance at the $p < 0.05$ level after Benjamini-Hochberg correction for test multiplicity; B) Spearman and biserial correlation coefficients are provided for continuous-continuous and binary-continuous variables correlations, respectively, with p-values indicated as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

A.



B.



VI. Bibliographie

1. Ashbaugh D, Bigelow DB, Petty T, Levine B (1967) Acute respiratory distress in adults. *The Lancet* 290:319–323
2. (2012) Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA* 307:.. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669>
3. Katzenstein AL, Bloor CM, Leibow AA (1976) Diffuse alveolar damage—the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol* 85:209–228
4. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ (1995) Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 151:293–301. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.2.7842182>
5. Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al (2016) Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* 315:788. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0291>
6. Zimmerman GA, Albertine KH, Carveth HJ, et al (1999) Endothelial activation in ARDS. *Chest* 116:18S-24S. https://doi.org/10.1378/chest.116.suppl_1.18s
7. Hastings RH, Folkesson HG, Matthay MA (2004) Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 286:L679–L689. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00205.2003>
8. Matthay MA, Wiener-Kronish JP (2012) Intact Epithelial Barrier Function Is Critical for the Resolution of Alveolar Edema in Humans. *American Review of Respiratory Disease*. https://doi.org/10.1164/ajrccm/142.6_Pt_1.1250
9. Sun S, Sursal T, Adibnia Y, et al (2013) Mitochondrial DAMPs Increase Endothelial Permeability through Neutrophil Dependent and Independent Pathways. *PLoS One* 8:e59989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059989>
10. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al (2012) Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 122:2661–2671. <https://doi.org/10.1172/JCI61303>
11. Bastarache JA, Wang L, Geiser T, et al (2007) The alveolar epithelium can initiate the extrinsic coagulation cascade through expression of tissue factor. *Thorax* 62:608–616. <https://doi.org/10.1136/thx.2006.063305>
12. Ware LB, Matthay MA (2001) Alveolar Fluid Clearance Is Impaired in the Majority of Patients with Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1376–1383. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.6.2004035>
13. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al (2002) Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest* 110:1703–1716. <https://doi.org/10.1172/JCI15849>

14. Matthay MA, Zemans RL (2011) The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment. *Annu Rev Pathol* 6:147–163. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130158>
15. Juss J, Herre J, Begg M, et al (2015) Genome-wide transcription profiling in neutrophils in acute respiratory distress syndrome. *The Lancet* 385:S55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60370-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60370-1)
16. Juss JK, House D, Amour A, et al (2016) Acute Respiratory Distress Syndrome Neutrophils Have a Distinct Phenotype and Are Resistant to Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 194:961–973. <https://doi.org/10.1164/rccm.201509-1818OC>
17. Huang X, Xiu H, Zhang S, Zhang G (2018) The Role of Macrophages in the Pathogenesis of ALI/ARDS. *Mediators Inflamm* 2018:. <https://doi.org/10.1155/2018/1264913>
18. D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, et al (2009) CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest* 119:2898–2913. <https://doi.org/10.1172/JCI36498>
19. Dreyfuss D, Saumon G (1998) Ventilator-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 157:294–323. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.1.9604014>
20. de Prost N, Ricard J-D, Saumon G, Dreyfuss D (2011) Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications. *Ann Intensive Care* 1:28. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-1-28>
21. Brower RG, Matthay MA, Morris A, et al (2000) Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine* 342:1301–1308
22. Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, et al (2005) Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Crit Care Med* 33:1–6; discussion 230-232. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000149854.61192.dc>
23. dos Santos CC, Slutsky AS (2000) Mechanotransduction, ventilator-induced lung injury and multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 26:638–642. <https://doi.org/10.1007/s001340051217>
24. Tomashefski JF (2000) Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 21:435–466
25. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, et al (2013) Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. *The Lancet Respiratory Medicine* 1:395–401. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70053-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70053-5)
26. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al (1994) The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149:818–824.

<https://doi.org/10.1164/ajrccm.149.3.7509706>

27. Gajic O, Dabbagh O, Park PK, et al (2011) Early Identification of Patients at Risk of Acute Lung Injury: Evaluation of Lung Injury Prediction Score in a Multicenter Cohort Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183:462–470. <https://doi.org/10.1164/rccm.201004-0549OC>
28. Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, et al (2005) Acute respiratory distress syndrome: Underrecognition by clinicians and diagnostic accuracy of three clinical definitions*: *Critical Care Medicine* 33:2228–2234. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000181529.08630.49>
29. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, et al (2013) Comparison of the Berlin Definition for Acute Respiratory Distress Syndrome with Autopsy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187:761–767. <https://doi.org/10.1164/rccm.201211-1981OC>
30. Lorente JA, Cardinal-Fernández P, Muñoz D, et al (2015) Acute respiratory distress syndrome in patients with and without diffuse alveolar damage: an autopsy study. *Intensive Care Medicine* 41:1921–1930. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-4046-0>
31. Esteban A, Fernández-Segoviano P, Frutos-Vivar F, et al (2004) Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. *Annals of internal medicine* 141:440–445
32. Schwarz MI, Albert RK (2004) “Imitators” of the ARDS: implications for diagnosis and treatment. *CHEST Journal* 125:1530–1535
33. Guerin_10 diseases that look like ARDS_ICM 2015.pdf
34. Matthay MA, McAuley DF, Ware LB (2017) Clinical trials in acute respiratory distress syndrome: challenges and opportunities. *The Lancet Respiratory Medicine* 5:524–534. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30188-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30188-1)
35. Ware LB, Koyama T, Billheimer DD, et al (2010) Prognostic and pathogenetic value of combining clinical and biochemical indices in patients with acute lung injury. *CHEST Journal* 137:288–296
36. García-Laorden MI, Lorente JA, Flores C, et al (2017) Biomarkers for the acute respiratory distress syndrome: how to make the diagnosis more precise. *Ann Transl Med* 5:. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.49>
37. Calfee CS, Delucchi K, Parsons PE, et al (2014) Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials. *The Lancet Respiratory Medicine* 2:611–620. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70097-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70097-9)
38. Famous KR, Delucchi K, Ware LB, et al (2017) Acute respiratory distress syndrome subphenotypes respond differently to randomized fluid management strategy. *American journal of respiratory and critical care medicine* 195:331–338

39. Bos LDJ, Laffey JG, Ware LB, et al (2022) Towards a biological definition of ARDS: are treatable traits the solution? *ICMx* 10:8. <https://doi.org/10.1186/s40635-022-00435-w>
40. DannyMcAuley (2022) Clinical Evaluation of a POC Assay to Identify Phenotypes in the Acute Respiratory Distress Syndrome. clinicaltrials.gov
41. Laffey JG, Madotto F, Bellani G, et al (2017) Geo-economic variations in epidemiology, patterns of care, and outcomes in patients with acute respiratory distress syndrome: insights from the LUNG SAFE prospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine* 5:627–638. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30213-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30213-8)
42. Krishnasamy VP, Hallowell BD, Ko JY, et al (2020) Update: Characteristics of a Nationwide Outbreak of E-cigarette, or Vaping, Product Use–Associated Lung Injury — United States, August 2019–January 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 69:90–94. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6903e2>
43. (2020) Clinical characteristics and day-90 outcomes of 4244 critically ill adults with COVID-19: a prospective cohort study. *Intensive Care Med* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06294-x>
44. Peiris JSM, Yuen KY, Osterhaus ADME, Stöhr K (2009) The Severe Acute Respiratory Syndrome. In: <https://doi.org/10.1056/NEJMra032498>. <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra032498>. Accessed 4 Feb 2022
45. Memish ZA, Zumla AI, Al-Hakeem RF, et al (2013) Family Cluster of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infections. In: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1303729>. <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1303729>. Accessed 4 Feb 2022
46. Papazian L, Calfee CS, Chiumello D, et al (2016) Diagnostic workup for ARDS patients. *Intensive Care Medicine* 42:674–685. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4324-5>
47. Guillen-Guio B, Lorenzo-Salazar JM, Ma S-F, et al (2020) Sepsis-associated acute respiratory distress syndrome in individuals of European ancestry: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med* 8:258–266. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30368-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30368-6)
48. van der Zee P, Rietdijk W, Somhorst P, et al (2020) A systematic review of biomarkers multivariately associated with acute respiratory distress syndrome development and mortality. *Crit Care* 24:243. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02913-7>
49. Blondonnet R, Constantin J-M, Sapin V, Jabaudon M (2016) A Pathophysiologic Approach to Biomarkers in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Dis Markers* 2016:.. <https://doi.org/10.1155/2016/3501373>
50. LUNG SAFE Investigators and the ESICM Trials Group, Madotto F, Pham T, et al (2018) Resolved versus confirmed ARDS after 24 h: insights from the LUNG SAFE study. *Intensive Care Med* 44:564–577. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5152-6>

51. (2019) Early Neuromuscular Blockade in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 380:1997–2008. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1901686>
52. Auriemma CL, Zhuo H, Delucchi K, et al (2020) Acute respiratory distress syndrome-attributable mortality in critically ill patients with sepsis. *Intensive Care Med* 46:1222–1231. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06010-9>
53. Stapleton RD, Wang BM, Hudson LD, et al (2005) Causes and Timing of Death in Patients With ARDS. *Chest* 128:525–532. <https://doi.org/10.1378/chest.128.2.525>
54. Gattinoni L, Pesenti A, Rossi GP, Vesconi S Preliminary Communication. 3
55. Hickling KG, Henderson SJ, Jackson R (1990) Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 16:372–377. <https://doi.org/10.1007/BF01735174>
56. Papazian L, Aubron C, Brochard L, et al (2019) Formal guidelines: management of acute respiratory distress syndrome. *Ann Intensive Care* 9:69. <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0540-9>
57. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, et al (2004) Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 351:327
58. Chiumello D, Carlesso E, Cadringer P, et al (2008) Lung Stress and Strain during Mechanical Ventilation for Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 178:346–355. <https://doi.org/10.1164/rccm.200710-1589OC>
59. Cressoni M, Cadringer P, Chiurazzi C, et al (2013) Lung Inhomogeneity in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 131121141258006. <https://doi.org/10.1164/rccm.201308-1567OC>
60. Amato MBP, Meade MO, Slutsky AS, et al (2015) Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 372:747–755. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa1410639>
61. Gattinoni L, Pesenti A (2005) The concept of “baby lung.” *Intensive Care Medicine* 31:776–784. <https://doi.org/10.1007/s00134-005-2627-z>
62. Meade MO, Cook DJ, Guyatt GH, et al (2008) Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *Jama* 299:637–645
63. Grasso S, Fanelli V, Cafarelli A, et al (2005) Effects of high versus low positive end-expiratory pressures in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1002–1008. <https://doi.org/10.1164/rccm.200407-940OC>
64. Mercat A, Richard J-CM, Vieille B, et al (2008) Positive End-Expiratory Pressure Setting

- in Adults With Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 299:646–655. <https://doi.org/10.1001/jama.299.6.646>
65. Briel M, Meade M, Mercat A, et al (2010) Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *Jama* 303:865–873
 66. Cavalcanti AB, Suzumura ÉA, Laranjeira LN, et al (2017) Effect of Lung Recruitment and Titrated Positive End-Expiratory Pressure (PEEP) vs Low PEEP on Mortality in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA* 318:1335–1345. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.14171>
 67. Guérin C, Reignier J, Richard J-C, et al (2013) Prone Positioning in Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* 368:2159–2168. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214103>
 68. Li J, Luo J, Pavlov I, et al (2022) Awake prone positioning for non-intubated patients with COVID-19-related acute hypoxaemic respiratory failure: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(22\)00043-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(22)00043-1)
 69. Coppo A, Bellani G, Winterton D, et al (2020) Feasibility and physiological effects of prone positioning in non-intubated patients with acute respiratory failure due to COVID-19 (PRON-COVID): a prospective cohort study. *Lancet Respir Med* 8:765–774. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30268-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30268-X)
 70. Gannier M, Roch A, Forel J-M, et al (2004) Effect of neuromuscular blocking agents on gas exchange in patients presenting with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 32:113–119. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000104114.72614.BC>
 71. Forel J-M, Roch A, Marin V, et al (2006) Neuromuscular blocking agents decrease inflammatory response in patients presenting with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 34:2749–2757. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000239435.87433.0D>
 72. Papazian L, Forel J-M, Gacouin A, et al (2010) Neuromuscular Blockers in Early Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* 363:1107–1116. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1005372>
 73. Huang DT, Angus DC, Moss M, et al (2017) Design and Rationale of the Reevaluation of Systemic Early Neuromuscular Blockade Trial for Acute Respiratory Distress Syndrome. *Ann Am Thorac Soc* 14:124–133. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201608-629OT>
 74. Tomashefski JF (2000) PULMONARY PATHOLOGY OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME. *Clinics in Chest Medicine* 21:435–466. [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(05\)70158-1](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(05)70158-1)
 75. (2006) Comparison of Two Fluid-Management Strategies in Acute Lung Injury. *New England Journal of Medicine* 354:2564–2575. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062200>

76. Devlin J, Skrobik Y, Gélinas C, et al (2018) Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Pain, Agitation/Sedation, Delirium, Immobility, and Sleep Disruption in Adult Patients in the ICU. *Critical Care Medicine* 46:1532–1548. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003259>
77. Girard TD, Alhazzani W, Kress JP, et al (2017) An Official American Thoracic Society/American College of Chest Physicians Clinical Practice Guideline: Liberation from Mechanical Ventilation in Critically Ill Adults. Rehabilitation Protocols, Ventilator Liberation Protocols, and Cuff Leak Tests. *Am J Respir Crit Care Med* 195:120–133. <https://doi.org/10.1164/rccm.201610-2075ST>
78. Lewis SR, Pritchard MW, Thomas CM, Smith AF (2019) Pharmacological agents for adults with acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2019:CD004477. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004477.pub3>
79. (2019) Early High-Dose Vitamin D3 for Critically Ill, Vitamin D–Deficient Patients. *N Engl J Med* 381:2529–2540. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911124>
80. McAuley DF, Laffey JG, O’Kane CM, et al (2014) Simvastatin in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* 371:1695–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1403285>
81. Ranieri VM, Pettilä V, Karvonen MK, et al (2020) Effect of Intravenous Interferon β -1a on Death and Days Free From Mechanical Ventilation Among Patients With Moderate to Severe Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 323:725–733. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22525>
82. Fowler AA, Truwit JD, Hite RD, et al (2019) Effect of Vitamin C Infusion on Organ Failure and Biomarkers of Inflammation and Vascular Injury in Patients With Sepsis and Severe Acute Respiratory Failure. *JAMA* 322:1261–1270. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.11825>
83. Smith FG, Perkins GD, Gates S, et al (2012) Effect of intravenous β -2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 379:229–235. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61623-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61623-1)
84. (2011) Randomized, Placebo-controlled Clinical Trial of an Aerosolized β 2-Agonist for Treatment of Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 184:561–568. <https://doi.org/10.1164/rccm.201012-2090OC>
85. Festic E, Carr GE, Cartin-Ceba R, et al (2017) Randomized Clinical Trial of a Combination of an Inhaled Corticosteroid and Beta Agonist in Patients at Risk of Developing the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med* 45:798–805. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002284>
86. Levitt JE, Festic E, Desai M, et al (2021) The ARREST Pneumonia Clinical Trial. Rationale and Design. *Ann Am Thorac Soc* 18:698–708. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.202009-1115SD>

87. Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, et al (2006) Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 354:1671–1684. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051693>
88. Villar J, Ferrando C, Martínez D, et al (2020) Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 8:267–276. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30417-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30417-5)
89. Combes A, Hajage D, Capellier G, et al (2018) Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 378:1965–1975. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800385>
90. Schmidt M, Hajage D, Lebreton G, et al (2020) Extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory distress syndrome associated with COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med* 8:1121–1131. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30328-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30328-3)
91. Matthay MA, Zimmerman GA (2005) Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:319–327. <https://doi.org/10.1165/rcmb.F305>
92. Sinha P, Delucchi KL, Chen Y, et al (2022) Latent class analysis-derived subphenotypes are generalisable to observational cohorts of acute respiratory distress syndrome: a prospective study. *Thorax* 77:13–21. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217158>
93. Calfee CS, Delucchi KL, Sinha P, et al (2018) ARDS Subphenotypes and Differential Response to Simvastatin: Secondary Analysis of a Randomized Controlled Trial. *Lancet Respir Med* 6:691–698. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30177-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30177-2)
94. Wick KD, McAuley DF, Levitt JE, et al (2021) Promises and challenges of personalized medicine to guide ARDS therapy. *Crit Care* 25:404. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03822-z>
95. Sinha P, Delucchi KL, Thompson BT, et al (2018) Latent Class Analysis of ARDS Subphenotypes: A Secondary Analysis of the Statins for Acutely Injured Lungs from Sepsis (SAILS) Study. *Intensive Care Med* 44:1859–1869. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5378-3>
96. Sinha P, Calfee CS, Cherian S, et al (2020) Prevalence of phenotypes of acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with COVID-19: a prospective observational study. *Lancet Respir Med* 8:1209–1218. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30366-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30366-0)
97. Heijnen NFL, Hagens LA, Smit MR, et al (2021) Biological Subphenotypes of Acute Respiratory Distress Syndrome Show Prognostic Enrichment in Mechanically Ventilated Patients without Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 203:1503–1511. <https://doi.org/10.1164/rccm.202006-2522OC>
98. Sterne JAC, Murthy S, Diaz JV, et al (2020) Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19.

JAMA 324:1–13. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.17023>

99. Shankar-Hari M, Vale CL, Godolphin PJ, et al (2021) Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19. *JAMA* 326:1–20. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.11330>
100. (2021) Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* 397:1637–1645. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00676-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00676-0)
101. (2020) Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 — Preliminary Report. *N Engl J Med* NEJMoa2021436. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436>
102. Luyt C-E, Bouadma L, Morris AC, et al (2020) Pulmonary infections complicating ARDS. *Intensive Care Med* 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06292-z>
103. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al (2007) Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clinical Infectious Diseases* 44:S27–S72. <https://doi.org/10.1086/511159>
104. Vallés J, Diaz E, Martín-Loeches I, et al (2016) Evolution over a 15-year period of the clinical characteristics and outcomes of critically ill patients with severe community-acquired pneumonia. *Med Intensiva* 40:238–245. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2015.07.005>
105. Choi S-H, Hong S-B, Ko G-B, et al (2012) Viral Infection in Patients with Severe Pneumonia Requiring Intensive Care Unit Admission. *Am J Respir Crit Care Med* 186:325–332. <https://doi.org/10.1164/rccm.201112-2240OC>
106. Wiemken T, Peyrani P, Bryant K, et al (2013) Incidence of respiratory viruses in patients with community-acquired pneumonia admitted to the intensive care unit: results from the Severe Influenza Pneumonia Surveillance (SIPS) project. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:705–710. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1802-8>
107. Metersky ML, Waterer G, Nsa W, Bratzler DW (2012) Predictors of In-Hospital vs Postdischarge Mortality in Pneumonia. *Chest* 142:476–481. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2393>
108. Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al (2015) Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N Engl J Med* 373:415–427. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500245>
109. MacIntyre CR, Chughtai AA, Barnes M, et al (2018) The role of pneumonia and secondary bacterial infection in fatal and serious outcomes of pandemic influenza a(H1N1)pdm09. *BMC Infect Dis* 18:637. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3548-0>
110. Hendrickson KW, Peltan ID, Brown SM (2021) The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome Before and After Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Clin* 37:703–716. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2021.05.001>

111. Prina E, Ranzani OT, Polverino E, et al (2015) Risk Factors Associated with Potentially Antibiotic-Resistant Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Annals ATS* 12:153–160. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201407-305OC>
112. Aliberti S, Reyes LF, Faverio P, et al (2016) Global initiative for meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia (GLIMP): an international, observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases* 16:1364–1376. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30267-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30267-5)
113. Di Pasquale MF, Sotgiu G, Gramegna A, et al (2019) Prevalence and Etiology of Community-acquired Pneumonia in Immunocompromised Patients. *Clin Infect Dis* 68:1482–1493. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy723>
114. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, et al (2015) Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *mBio* 6:e00037-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00037-15>
115. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, et al (2015) Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann Am Thorac Soc* 12:821–830. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201501-029OC>
116. Günther A, Siebert C, Schmidt R, et al (1996) Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 153:176–184. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.153.1.8542113>
117. Wu H, Kuzmenko A, Wan S, et al (2003) Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest* 111:1589–1602. <https://doi.org/10.1172/JCI200316889>
118. Nakagawa NK, Franchini ML, Driusso P, et al (2005) Mucociliary Clearance Is Impaired in Acutely Ill Patients. *Chest* 128:2772–2777. <https://doi.org/10.1378/chest.128.4.2772>
119. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, et al (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109:317–325. <https://doi.org/10.1172/JCI13870>
120. Freestone P (2013) Communication between Bacteria and Their Hosts. *Scientifica (Cairo)* 2013:361073. <https://doi.org/10.1155/2013/361073>
121. Dickson RP, Erb-Downward JR, Prescott HC, et al (2015) Intraalveolar Catecholamines and the Human Lung Microbiome. *Am J Respir Crit Care Med* 192:257–259. <https://doi.org/10.1164/rccm.201502-0326LE>
122. Dickson RP, Schultz MJ, van der Poll T, et al (2020) Lung Microbiota Predict Clinical Outcomes in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 201:555–563. <https://doi.org/10.1164/rccm.201907-1487OC>
123. Panzer AR, Lynch SV, Langelier C, et al (2018) Lung Microbiota Is Related to Smoking Status and to Development of Acute Respiratory Distress Syndrome in Critically Ill Trauma Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 197:621–631.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201702-0441OC>

124. Quinton LJ, Mizgerd JP (2015) Dynamics of Lung Defense in Pneumonia: Resistance, Resilience, and Remodeling. *Annu Rev Physiol* 77:407–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071937>
125. Chollet-Martin S, Montravers P, Gibert C, et al (1993) High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun* 61:4553–4559
126. Wiedermann FJ, Mayr AJ, Kaneider NC, et al (2004) Alveolar Granulocyte Colony-Stimulating Factor and α -Chemokines in Relation to Serum Levels, Pulmonary Neutrophilia, and Severity of Lung Injury in ARDS. *Chest* 125:212–219. <https://doi.org/10.1378/chest.125.1.212>
127. Gaggar A, Jackson PL, Noerager BD, et al (2008) A Novel Proteolytic Cascade Generates an Extracellular Matrix-Derived Chemoattractant in Chronic Neutrophilic Inflammation. *J Immunol* 180:5662–5669
128. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science* 303:1532–1535
129. Grommes J, Soehnlein O (2011) Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. *Mol Med* 17:293–307. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00138>
130. Aggarwal A, Baker CS, Evans TW, Haslam PL (2000) G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. *European Respiratory Journal* 15:895–901
131. Abraham E (2003) Neutrophils and acute lung injury: *Critical Care Medicine* 31:S195–S199. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000057843.47705.E8>
132. Grégoire M, Uhel F, Lesouhaitier M, et al (2018) Impaired efferocytosis and neutrophil extracellular trap clearance by macrophages in ARDS. *European Respiratory Journal* 52:. <https://doi.org/10.1183/13993003.02590-2017>
133. Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, et al (1994) Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 150:113–122. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.150.1.8025736>
134. Fox ED, Heffernan DS, Cioffi WG, Reichner JS (2013) Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. *Crit Care* 17:R226. <https://doi.org/10.1186/cc13049>
135. Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J (2000) Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage-or endotoxemia-induced acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279:L1137–L1145
136. Azoulay E, Darmon M, Delclaux C, et al Deterioration of previous acute lung injury during neutropenia recovery. *Crit Care Med* 30:781–786

137. Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP (2018) Integrative Physiology of Pneumonia. *Physiol Rev* 98:1417–1464. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2017>
138. Cheng OZ, Palaniyar N (2013) NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol* 4:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00001>
139. Tadie J-M, Bae H-B, Jiang S, et al (2013) HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 304:L342–L349. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00151.2012>
140. Parker H, Winterbourn CC (2013) Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol* 3:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00424>
141. Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al (2009) Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 15:1318–1321. <https://doi.org/10.1038/nm.2053>
142. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, et al (2011) Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. *Am J Pathol* 179:199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.013>
143. Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, et al (2012) Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood* 119:6335–6343. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405183>
144. Kaplan MJ, Radic M (2012) Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 189:2689–2695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>
145. Papayannopoulos V (2017) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology* 18:134–147. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>
146. Hussell T, Bell TJ (2014) Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 14:81–93. <https://doi.org/10.1038/nri3600>
147. Kopf M, Schneider C, Nobs SP (2015) The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol* 16:36–44. <https://doi.org/10.1038/ni.3052>
148. Westphalen K, Gusarova GA, Islam MN, et al (2014) Sessile alveolar macrophages modulate immunity through connexin 43-based epithelial communication. *Nature* 506:503–506. <https://doi.org/10.1038/nature12902>
149. Herold S, Mayer K, Lohmeyer J (2011) Acute Lung Injury: How Macrophages Orchestrate Resolution of Inflammation and Tissue Repair. *Front Immunol* 2:65. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00065>
150. Short KR, Kroeze EJBV, Fouchier RAM, Kuiken T (2014) Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Infectious Diseases* 14:57–69. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70286-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70286-X)

151. Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR (2014) Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 306:L709–L725. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00341.2013>
152. Wang N, Liang H, Zen K (2014) Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Front Immunol* 5:614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>
153. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, et al (2005) MACROPHAGE RECEPTORS AND IMMUNE RECOGNITION. *Annu Rev Immunol* 23:901–944. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816>
154. Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, et al (2003) Alveolar Macrophage Apoptosis Contributes to Pneumococcal Clearance in a Resolving Model of Pulmonary Infection. *The Journal of Immunology* 171:5380–5388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5380>
155. Aegerter H, Kulikauskaite J, Crotta S, et al (2020) Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nat Immunol* 21:145–157. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0568-x>
156. Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, et al (2008) A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat Immunol* 9:1074–1083. <https://doi.org/10.1038/ni.1637>
157. Nakazawa D, Shida H, Kusunoki Y, et al (2016) The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *Journal of Autoimmunity* 67:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.018>
158. Schneberger D, Aharonson-Raz K, Singh B (2011) Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. *Cell Tissue Res* 343:97–106. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1032-2>
159. Maus U, von Grote K, Kuziel WA, et al (2002) The Role of CC Chemokine Receptor 2 in Alveolar Monocyte and Neutrophil Immigration in Intact Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 166:268–273. <https://doi.org/10.1164/rccm.2112012>
160. Chen L, Zhang Z, Barletta KE, et al (2013) Heterogeneity of lung mononuclear phagocytes during pneumonia: contribution of chemokine receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305:L702–L711. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00194.2013>
161. Maus U, Herold S, Muth H, et al (2001) Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 280:L58–L68. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.1.L58>
162. Xiong H, Keith JW, Samilo DW, et al (2016) Innate lymphocyte/Ly6Chi monocyte crosstalk promotes *Klebsiella pneumoniae* clearance. *Cell* 165:679–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.017>

163. Donnelly SC, Haslett C, Strieter RM, et al (1993) Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *The Lancet* 341:643–647
164. Zamjahn JB, Quinton LJ, Mack JC, et al (2011) Differential flux of macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant from the lung after intrapulmonary delivery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301:L568–L574. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00340.2010>
165. Williams AE, Chambers RC (2014) The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 306:L217–L230. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00311.2013>
166. Webster SJ, Daigneault M, Bewley MA, et al (2010) Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol* 185:2968–2979. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000805>
167. Whitsett JA, Alenghat T (2014) Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 16:27–35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>
168. Yamamoto K, Ahyi A-NN, Pepper-Cunningham ZA, et al (2014) Roles of Lung Epithelium in Neutrophil Recruitment during Pneumococcal Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50:253–262. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0114OC>
169. Pastva AM, Wright JR, Williams KL (2007) Immunomodulatory Roles of Surfactant Proteins A and D. *Proc Am Thorac Soc* 4:252–257. <https://doi.org/10.1513/pats.200701-018AW>
170. Pittet LA, Quinton LJ, Yamamoto K, et al (2011) Earliest Innate Immune Responses Require Macrophage RelA during Pneumococcal Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:573–581. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0210OC>
171. Paats MS, Bergen IM, Hanselaar WEJJ, et al (2013) T helper 17 cells are involved in the local and systemic inflammatory response in community-acquired pneumonia. *Thorax* 68:468–474. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202168>
172. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, et al (2014) Activation of Type 3 Innate Lymphoid Cells and Interleukin 22 Secretion in the Lungs During *Streptococcus pneumoniae* Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 210:493–503. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu106>
173. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, et al (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14:275–281. <https://doi.org/10.1038/nm1710>
174. Chen K, Eddens T, Trevejo-Nunez G, et al (2016) IL-17 receptor signaling in the lung epithelium is required for mucosal chemokine gradients and pulmonary host defense against *K. pneumoniae*. *Cell Host Microbe* 20:596–605. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.003>

175. Kamata H, Yamamoto K, Wasserman GA, et al (2016) Epithelial Cell–Derived Secreted and Transmembrane 1a Signals to Activated Neutrophils during Pneumococcal Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 55:407–418. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0261OC>
176. Clement CG, Evans SE, Evans CM, et al (2008) Stimulation of Lung Innate Immunity Protects against Lethal Pneumococcal Pneumonia in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1322–1330. <https://doi.org/10.1164/rccm.200607-1038OC>
177. Evans SE, Xu Y, Tuvim MJ, Dickey BF (2010) Inducible Innate Resistance of Lung Epithelium to Infection. *Annu Rev Physiol* 72:413–435. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135909>
178. Leiva-Juárez MM, Ware HH, Kulkarni VV, et al (2016) Inducible epithelial resistance protects mice against leukemia-associated pneumonia. *Blood* 128:982–992. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-708511>
179. Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE (2018) Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol* 11:21–34. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.71>
180. Panda SK, Colonna M (2019) Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. *Front Immunol* 10:861. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00861>
181. Kaiko GE, Phipps S, Angkasekwinai P, et al (2010) NK Cell Deficiency Predisposes to Viral-Induced Th2-Type Allergic Inflammation via Epithelial-Derived IL-25. *The Journal of Immunology* 185:4681–4690. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001758>
182. Jayaraman A, Jackson DJ, Message SD, et al (2014) IL-15 complexes induce NK cell and T cell responses independent of type I IFN signalling during rhinovirus infection. *Mucosal Immunol* 7:1151–1164. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.2>
183. Heath WR, Carbone FR (2009) Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol* 10:1237–1244. <https://doi.org/10.1038/ni.1822>
184. Guilliams M, Henri S, Tamoutounour S, et al (2010) From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur J Immunol* 40:2089–2094. <https://doi.org/10.1002/eji.201040498>
185. Lin KL, Suzuki Y, Nakano H, et al (2008) CCR2+ Monocyte-Derived Dendritic Cells and Exudate Macrophages Produce Influenza-Induced Pulmonary Immune Pathology and Mortality. *The Journal of Immunology* 180:2562–2572. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2562>
186. Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, et al (2006) Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 203:1805–1815. <https://doi.org/10.1084/jem.20052545>
187. Casadevall A, Scharff MD (1994) Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1695–

188. Cecil RL (1997) Present status of serum therapy in pneumonia. 1939. *Bull N Y Acad Med* 74:341–354
189. Gessner BD, Adegbola RA (2008) The impact of vaccines on pneumonia: key lessons from *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Vaccine* 26 Suppl 2:B3-8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.013>
190. Grijalva CG, Zhu Y, Williams DJ, et al (2015) Association between hospitalization with community acquired laboratory-confirmed influenza pneumonia and prior receipt of influenza vaccination. *JAMA* 314:1488–1497. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.12160>
191. Hueso T, Godron A-S, Lanoy E, et al (2022) Convalescent plasma improves overall survival in patients with B-cell lymphoid malignancy and COVID-19: a longitudinal cohort and propensity score analysis. *Leukemia* 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01511-6>
192. Marshall NB, Swain SL (2011) Cytotoxic CD4 T Cells in Antiviral Immunity. *J Biomed Biotechnol* 2011:954602. <https://doi.org/10.1155/2011/954602>
193. Raju R, Peters BS, Breen RAM (2012) Lung infections in the HIV-infected adult: Current Opinion in Pulmonary Medicine 18:253–258. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32835213d3>
194. Chen K, Kolls JK (2013) T Cell-Mediated Host Immune Defenses in the Lung. *Annu Rev Immunol* 31:605–633. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100019>
195. Jiang J, Fisher EM, Murasko DM (2011) CD8 T Cell Responses to Influenza Virus Infection in Aged Mice. *Ageing Res Rev* 10:422–427. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.02.001>
196. Peiris J, Hui KP, Yen H-L (2010) Host response to Influenza virus: protection versus immunopathology. *Curr Opin Immunol* 22:475–481. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.06.003>
197. Woodworth JSM, Behar SM (2006) Mycobacterium tuberculosis specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Crit Rev Immunol* 26:317–352
198. Carvalho A, De Luca A, Bozza S, et al (2012) TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8+ T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients. *Blood* 119:967–977. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-362582>
199. Allister FM, Steele C, Zheng M, et al (2004) T Cytotoxic-1 CD8+ T Cells Are Effector Cells against *Pneumocystis* in Mice. *The Journal of Immunology* 172:1132–1138. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1132>
200. Meissner NN, Lund FE, Han S, Harmsen A (2005) CD8 T Cell-Mediated Lung Damage in Response to the Extracellular Pathogen *Pneumocystis* Is Dependent on MHC Class I

- Expression by Radiation-Resistant Lung Cells. *The Journal of Immunology* 175:8271–8279. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8271>
201. Hinks TSC, Wallington JC, Williams AP, et al (2016) Steroid-induced Deficiency of Mucosal-associated Invariant T Cells in the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Lung. Implications for Nontypeable *Haemophilus influenzae* Infection. *Am J Respir Crit Care Med* 194:1208–1218. <https://doi.org/10.1164/rccm.201601-0002OC>
 202. Meierovics AI, Cowley SC (2016) MAIT cells promote inflammatory monocyte differentiation into dendritic cells during pulmonary intracellular infection. *J Exp Med* 213:2793–2809. <https://doi.org/10.1084/jem.20160637>
 203. Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, et al (2021) Pneumonia. *Nat Rev Dis Primers* 7:25. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00259-0>
 204. Allard B, Panariti A, Martin JG (2018) Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection. *Front Immunol* 9:1777. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01777>
 205. Serhan CN, Levy BD Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest* 128:2657–2669. <https://doi.org/10.1172/JCI97943>
 206. Sham HP, Walker KH, Abdunour R-EE, et al (2018) 15-epi-Lipoxin A4, Resolvin D2 and Resolvin D3 induce NF- κ B regulators in bacterial pneumonia. *J Immunol* 200:2757–2766. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602090>
 207. Poe SL, Arora M, Oriss TB, et al (2013) STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. *Mucosal Immunol* 6:189–199. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.62>
 208. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, et al (2011) Innate lymphoid cells promote lung tissue homeostasis following acute influenza virus infection. *Nat Immunol* 12:1045–1054. <https://doi.org/10.1031/ni.2131>
 209. Laidlaw BJ, Zhang N, Marshall HD, et al (2014) CD4+ T Cell Help Guides Formation of CD103+ Lung-Resident Memory CD8+ T Cells during Influenza Viral Infection. *Immunity* 41:633–645. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.007>
 210. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
 211. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, et al (2016) Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193:259–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>
 212. Martin GS, Mannino DM, Moss M (2006) The effect of age on the development and outcome of adult sepsis*: *Critical Care Medicine* 34:15–21. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000194535.82812.BA>

213. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13:260–268. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70001-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70001-X)
214. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG (2017) The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 17:407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.36>
215. Patera AC, Drewry AM, Chang K, et al (2016) Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol*. <https://doi.org/10.1189/jlb.4HI0616-255R>
216. Venet F, Monneret G (2018) Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* 14:121–137. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.165>
217. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140:805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
218. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, et al (2012) Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest* 122:2711–2719. <https://doi.org/10.1172/JCI62423>
219. Deutschman CS, Tracey KJ (2014) Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity* 40:463–475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.001>
220. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T (2014) Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 5:36–44. <https://doi.org/10.4161/viru.25436>
221. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, et al (2015) Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol* 6:257. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>
222. Guo R-F, Ward PA (2005) ROLE OF C5A IN INFLAMMATORY RESPONSES. *Annu Rev Immunol* 23:821–852. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115835>
223. Shao Z, Nishimura T, Leung LLK, Morser J (2015) Carboxypeptidase B2 Deficiency Reveals Opposite Effects of Complement C3a and C5a in a Murine Polymicrobial Sepsis Model. *J Thromb Haemost* 13:1090–1102. <https://doi.org/10.1111/jth.12956>
224. Levi M, van der Poll T (2017) Coagulation and sepsis. *Thrombosis Research* 149:38–44. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.11.007>
225. Warren BL, Eid A, Singer P, et al (2001) High-Dose Antithrombin III in Severe Sepsis: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 286:1869–1878. <https://doi.org/10.1001/jama.286.15.1869>
226. Abraham E, Reinhart K, Opal S, et al (2003) Efficacy and Safety of Tifacogin (Recombinant Tissue Factor Pathway Inhibitor) in Severe Sepsis: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 290:238–247. <https://doi.org/10.1001/jama.290.2.238>

227. Bernard GR, Vincent J-L, Laterre P-F, et al (2001) Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. *N Engl J Med* 344:699–709. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103083441001>
228. Yipp BG, Kubes P (2013) NETosis: how vital is it? *Blood* 122:2784–2794. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671>
229. Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, et al (2016) Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS One* 11:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148142>
230. Sanchez T (2016) Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Endothelial Disorders. *Curr Atheroscler Rep* 18:31. <https://doi.org/10.1007/s11883-016-0586-1>
231. Mikacenic C, Hahn WO, Price BL, et al (2015) Biomarkers of Endothelial Activation Are Associated with Poor Outcome in Critical Illness. *PLoS One* 10:e0141251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141251>
232. Claushuis TAM, van Vught LA, Scicluna BP, et al (2016) Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. *Blood* 127:3062–3072. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-680744>
233. de Stoppelaar S, van 't Veer C, Poll T van der (2014) The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost* 112:666–677. <https://doi.org/10.1160/TH14-02-0126>
234. Boomer JS, To K, Chang KC, et al (2011) Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama* 306:2594–2605
235. Venet F, Rimmelé T, Monneret G (2018) Management of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Critical Care Clinics* 34:97–106. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2017.08.007>
236. Hsieh Y-C, Athar M, Chaudry IH (2009) When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis. *Trends Mol Med* 15:129. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.002>
237. Oami T, Watanabe E, Hatano M, et al (2017) Suppression of T Cell Autophagy Results in Decreased Viability and Function of T Cells Through Accelerated Apoptosis in a Murine Sepsis Model*. *Crit Care Med* 45:e77–e85. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002016>
238. Lin C-W, Lo S, Hsu C, et al (2014) T-Cell Autophagy Deficiency Increases Mortality and Suppresses Immune Responses after Sepsis. *PLoS One* 9:e102066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102066>
239. Gustave C-A, Gossez M, Demaret J, et al (2018) Septic Shock Shapes B Cell Response toward an Exhausted-like/Immunoregulatory Profile in Patients. *The Journal of Immunology* 200:2418–2425. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700929>
240. Seeley JJ, Ghosh S (2017) Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to

- LPS. *Journal of Leukocyte Biology* 101:107–119. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0316-118RR>
241. Biswas SK, Lopez-Collazo E (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology* 30:475–487. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.009>
 242. Wolk K, Döcke W-D, Baehr V von, et al (2000) Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 96:218–223
 243. Shalova IN, Lim JY, Chittechath M, et al (2015) Human Monocytes Undergo Functional Re-programming during Sepsis Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Immunity* 42:484–498. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.001>
 244. Munoz C, Carlet J, Fitting C, et al (1991) Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88:1747–1754
 245. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A (2008) Monitoring Immune Dysfunctions in the Septic Patient: A New Skin for the Old Ceremony. *Mol Med* 14:64–78. <https://doi.org/10.2119/2007-00102.Monneret>
 246. Monneret G, Finck M-E, Venet F, et al (2004) The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 95:193–198. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.07.009>
 247. Cavaillon J-M, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M (2005) Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 11:311–320. <https://doi.org/10.1179/096805105X58733>
 248. Buttenschoen K, Kormmann M, Berger D, et al (2008) Endotoxemia and endotoxin tolerance in patients with ARDS. *Langenbecks Arch Surg* 393:473–478. <https://doi.org/10.1007/s00423-008-0317-3>
 249. Sternberg EM (2006) Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 6:318–328. <https://doi.org/10.1038/nri1810>
 250. Chavan SS, Tracey KJ (2017) Essential Neuroscience in Immunology. *J Immunol* 198:3389–3397. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601613>
 251. Dalli J, Colas RA, Arnardottir H, Serhan CN (2017) Vagal regulation of Group 3 innate lymphoid cells and the immunoresolvent PCTR1 controls infection resolution. *Immunity* 46:92–105. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.009>
 252. Stolk RF, van der Poll T, Angus DC, et al (2016) Potentially Inadvertent Immunomodulation: Norepinephrine Use in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 194:550–558. <https://doi.org/10.1164/rccm.201604-0862CP>
 253. Davenport EE, Burnham KL, Radhakrishnan J, et al (2016) Genomic landscape of the

- individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med* 4:259–271. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00046-1)
254. Burnham KL, Davenport EE, Radhakrishnan J, et al (2017) Shared and Distinct Aspects of the Sepsis Transcriptomic Response to Fecal Peritonitis and Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 196:328–339. <https://doi.org/10.1164/rccm.201608-1685OC>
 255. Reyes M, Filbin MR, Bhattacharyya RP, et al (2020) An immune cell signature of bacterial sepsis. *Nat Med* 26:333–340. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0752-4>
 256. Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL (2011) Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics* 6:273–283. <https://doi.org/10.4161/epi.6.3.14017>
 257. Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, et al (2013) Immunotherapy for the Adjunctive Treatment of Sepsis: From Immunosuppression to Immunostimulation. Time for a Paradigm Change? *Am J Respir Crit Care Med* 187:1287–1293. <https://doi.org/10.1164/rccm.201301-0036CP>
 258. El Gazzar M, McCall CE (2010) MicroRNAs Distinguish Translational from Transcriptional Silencing during Endotoxin Tolerance. *J Biol Chem* 285:20940–20951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.115063>
 259. El Gazzar M, Liu T, Yoza BK, McCall CE (2010) Dynamic and Selective Nucleosome Repositioning during Endotoxin Tolerance. *J Biol Chem* 285:1259–1271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067330>
 260. Wen H, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL (2008) Epigenetic regulation of dendritic cell–derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood* 111:1797–1804. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-106443>
 261. Gazzar ME, Yoza BK, Chen X, et al (2009) Chromatin-Specific Remodeling by HMGB1 and Linker Histone H1 Silences Proinflammatory Genes during Endotoxin Tolerance. *Mol Cell Biol* 29:1959–1971. <https://doi.org/10.1128/MCB.01862-08>
 262. Cavassani KA, Carson WF, Moreira AP, et al (2010) The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood* 115:4403–4411. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-241083>
 263. Cheng S-C, Scicluna BP, Arts RJW, et al (2016) Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nat Immunol* 17:406–413. <https://doi.org/10.1038/ni.3398>
 264. Stienstra R, Netea-Maier RT, Riksen NP, et al (2017) Specific and Complex Reprogramming of Cellular Metabolism in Myeloid Cells during Innate Immune Responses. *Cell Metab* 26:142–156. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.001>
 265. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J (2016) A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 16:553–565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>

266. Guérin E, Orabona M, Raquil M-A, et al (2014) Circulating Immature Granulocytes With T-Cell Killing Functions Predict Sepsis Deterioration*: *Critical Care Medicine* 42:2007–2018. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000344>
267. Kovach MA, Standiford TJ (2012) The function of neutrophils in sepsis: *Current Opinion in Infectious Diseases* 25:321–327. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283528c9b>
268. Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ (2010) NEUTROPHIL PARALYSIS IN SEPSIS. *Shock* 34:15–21. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181e7e61b>
269. Demaret J, Venet F, Friggeri A, et al (2015) Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology* 98:1081–1090. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0415-168RR>
270. Hampson P, Dinsdale RJ, Wearn CM, et al (2017) Neutrophil Dysfunction, Immature Granulocytes, and Cell-free DNA are Early Biomarkers of Sepsis in Burn-injured Patients: A Prospective Observational Cohort Study. *Annals of Surgery* 265:1241–1249. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001807>
271. Stephan F, Yang K, Tankovic J, et al (2002) Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients: *Critical Care Medicine* 30:315–322. <https://doi.org/10.1097/00003246-200202000-00009>
272. Grégoire M, Tadié J-M, Uhel F, et al (2017) Frontline Science: HMGB1 induces neutrophil dysfunction in experimental sepsis and in patients who survive septic shock. *J Leukoc Biol* 101:1281–1287. <https://doi.org/10.1189/jlb.5HI0316-128RR>
273. Huang X, Chen Y, Chung C-S, et al (2014) Identification of B7-H1 as a Novel Mediator of the Innate Immune/Proinflammatory Response as well as a Possible Myeloid Cell Prognostic Biomarker in Sepsis. *The Journal of Immunology* 192:1091–1099. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302252>
274. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, et al (2020) Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* 182:1419-1440.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.001>
275. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M (2006) Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 10:233. <https://doi.org/10.1186/cc5055>
276. Draisma A, Pickkers P, Bouw MPWJM, van der Hoeven JG (2009) Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit Care Med* 37:1261–1267. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819c3c67>
277. Simpson SQ, Modi HN, Balk RA, et al (1991) Reduced alveolar macrophage production of tumor necrosis factor during sepsis in mice and men. *Crit Care Med* 19:1060–1066. <https://doi.org/10.1097/00003246-199108000-00015>
278. Reddy RC, Chen GH, Newstead MW, et al (2001) Alveolar Macrophage Deactivation in Murine Septic Peritonitis: Role of Interleukin 10. *Infect Immun* 69:1394–1401.

<https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1394-1401.2001>

279. Philippart F, Fitting C, Cavaillon J-M (2012) Lung microenvironment contributes to the resistance of alveolar macrophages to develop tolerance to endotoxin*. *Critical Care Medicine* 40:2987–2996. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31825b8d57>
280. Chalk K, Meisel C, Spies C, et al (2013) Dysfunction of alveolar macrophages after cardiac surgery and postoperative pneumonia?—an observational study. *Critical Care* 17:R285
281. Hoogerwerf JJ, de Vos AF, van't Veer C, et al (2010) Priming of Alveolar Macrophages upon Instillation of Lipopolysaccharide in the Human Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42:349–356. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0362OC>
282. Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D, et al (2013) Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 25:477–483. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.05.006>
283. Monneret G, Venet F (2016) Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 90:376–386. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21270>
284. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al (2006) Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Medicine* 32:1175–1183. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0204-8>
285. Landelle C, Lepape A, Voirin N, et al (2010) Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 36:1859–1866. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-1962-x>
286. Zhang Y, Zhou Y, Lou J, et al (2010) PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Critical Care* 14:R220. <https://doi.org/10.1186/cc9354>
287. Tai H, Xing H, Xiang D, et al (2018) Monocyte Programmed Death Ligand-1, A Predictor for 28-Day Mortality in Septic Patients. *The American Journal of the Medical Sciences* 355:362–367. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.12.008>
288. Zhao Y, Jia Y, Li C, et al (2019) Predictive Value of Soluble Programmed Death-1 for Severe Sepsis and Septic Shock During the First Week in an Intensive Care Unit. *Shock* 51:289–297. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001171>
289. Shao R, Fang Y, Yu H, et al (2016) Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3?4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Critical Care* 20:. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1301-x>
290. Uhel F, Azzaoui I, Grégoire M, et al (2017) 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.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201606-1143OC>

291. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M (2007) Determining the Degree of Immunodysregulation in Sepsis. In: Ronco C, Bellomo R, Kellum JA (eds) *Contributions to Nephrology*. KARGER, Basel, pp 101–111
292. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Cavaillon J-M, Adib-Conquy M (2013) Bench-to-bedside review: Natural killer cells in sepsis - guilty or not guilty? *Crit Care* 17:235. <https://doi.org/10.1186/cc12700>
293. Hall MW, Knatz NL, Vetterly C, et al (2011) Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Medicine* 37:525–532. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-2088-x>
294. Fumeaux T, Dufour J, Stern S, Pugin J (2004) Immune monitoring of patients with septic shock by measurement of intraleukocyte cytokines. *Intensive Care Med* 30:2028–2037. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2429-8>
295. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13:862–874. <https://doi.org/10.1038/nri3552>
296. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al (2002) Depletion of Dendritic Cells, But Not Macrophages, in Patients with Sepsis. *J Immunol* 168:2493–2500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2493>
297. Guisset O, Dilhuydy M-S, Thiébaud R, et al (2007) Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med* 33:148–152. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0436-7>
298. Grimaldi D, Louis S, Pène F, et al (2011) Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Medicine* 37:1438–1446. <https://doi.org/10.1007/s00134-011-2306-1>
299. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, et al (2009) Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care* 13:R119. <https://doi.org/10.1186/cc7969>
300. Ost M, Singh A, Peschel A, et al (2016) Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Front Cell Infect Microbiol* 6:37. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00037>
301. Mathias B, Delmas AL, Ozrazgat-Baslanti T, et al (2017) Human Myeloid-Derived Suppressor Cells are Associated with Chronic Immune Suppression after Severe Sepsis/Septic Shock. *Ann Surg* 265:827–834. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001783>
302. Bauer-Dörries A, De Cupis S, Liaudet L (2017) Rôle potentiel de la noradrénaline dans la dysfonction immunitaire du sepsis. *Revue Médicale Suisse* 13:1350–1353. <https://doi.org/10.53738/REVMED.2017.13.569.1350>

303. Roth G, Moser B, Krenn C, et al (2003) Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem Biophys Res Commun* 308:840–846. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01482-7](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01482-7)
304. Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, et al (1997) Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 25:1298–1307
305. Venet F, Davin F, Guignant C, et al (2010) Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* 34:358–363. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181dc0977>
306. Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A, et al (2013) Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Crit Care Med* 41:111–119. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182657948>
307. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, et al (2014) Persistent Lymphopenia after Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality. *Shock* 42:383–391. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000234>
308. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al (2002) Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18:487–494. <https://doi.org/10.1097/00024382-200212000-00001>
309. Felmet KA, Hall MW, Clark RSB, et al (2005) Prolonged Lymphopenia, Lymphoid Depletion, and Hypoprolactinemia in Children with Nosocomial Sepsis and Multiple Organ Failure. *The Journal of Immunology* 174:3765–3772. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3765>
310. Inoue S, Suzuki-Utsunomiya K, Okada Y, et al (2013) Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Crit Care Med* 41:810–819. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318274645f>
311. Heffernan DS, Monaghan SF, Thakkar RK, et al (2012) Failure to normalize lymphopenia following trauma is associated with increased mortality, independent of the leukocytosis pattern. *Crit Care* 16:R12. <https://doi.org/10.1186/cc11157>
312. Huang L, Yao Y, Dong N, et al (2010) Association between regulatory T cell activity and sepsis and outcome of severely burned patients: a prospective, observational study. *Crit Care* 14:R3. <https://doi.org/10.1186/cc8232>
313. Venet F, Chung C-S, Kherouf H, et al (2009) Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25+CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 35:678–686. <https://doi.org/10.1007/s00134-008-1337-8>
314. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS (2014) The changing immune system in sepsis. *Virulence* 5:45–56. <https://doi.org/10.4161/viru.26516>
315. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, et al (1999) Selective defects of T lymphocyte

- function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am J Surg* 178:288–292. [https://doi.org/10.1016/s0002-9610\(99\)00183-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9610(99)00183-x)
316. Venet F, Pachot A, Debard A-L, et al (2004) 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
 317. Xu J, Li J, Xiao K, et al (2020) Dynamic changes in human HLA-DRA gene expression and Th cell subsets in sepsis: Indications of immunosuppression and associated outcomes. *Scandinavian Journal of Immunology* 91:e12813. <https://doi.org/10.1111/sji.12813>
 318. Danahy DB, Strother RK, Badovinac VP, Griffith TS (2016) Clinical and Experimental Sepsis Impairs CD8 T-Cell-Mediated Immunity. *Crit Rev Immunol* 36:57–74. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2016017098>
 319. Guignant C, Lepape A, Huang X, et al (2011) Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Critical Care* 15:R99. <https://doi.org/10.1186/cc10112>
 320. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM (2012) A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care* 16:R112. <https://doi.org/10.1186/cc11404>
 321. Huang X, Venet F, Wang YL, et al (2009) PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:6303–6308
 322. Brahmamdam P, Inoue S, Unsinger J, et al (2010) Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 88:233–240. <https://doi.org/10.1189/jlb.0110037>
 323. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, et al (2016) Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of the macrophage activation syndrome: Re-analysis of a prior Phase III trial. *Crit Care Med* 44:275–281. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001402>
 324. Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, et al (2004) Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med* 32:2173–2182. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000145229.59014.6c>
 325. Daviaud F, Grimaldi D, Dechartres A, et al (2015) Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care* 5:16. <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0058-8>
 326. Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, Ayala A (2014) The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med* 20:224–233. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.002>
 327. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, et al (2009) GM-CSF to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind randomized placebo-controlled multicenter trial.

328. Bo L, Wang F, Zhu J, et al (2011) Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit Care* 15:R58. <https://doi.org/10.1186/cc10031>
329. Inoue S, Unsinger J, Davis CG, et al (2010) IL-15 Prevents Apoptosis, Reverses Innate and Adaptive Immune Dysfunction, and Improves Survival in Sepsis. *J Immunol* 184:1401–1409. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902307>
330. Fry TJ, Mackall CL (2005) The Many Faces of IL-7: From Lymphopoiesis to Peripheral T Cell Maintenance. *The Journal of Immunology* 174:6571–6576. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6571>
331. Venet F, Foray A-P, Villars-Méchin A, et al (2012) IL-7 Restores Lymphocyte Functions in Septic Patients. *The Journal of Immunology* 189:5073–5081. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202062>
332. McBride MA, Patil TK, Bohannon JK, et al (2021) Immune Checkpoints: Novel Therapeutic Targets to Attenuate Sepsis-Induced Immunosuppression. *Front Immunol* 11:624272. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.624272>
333. Chang K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C, et al (2014) Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit Care* 18:R3. <https://doi.org/10.1186/cc13176>
334. Shindo Y, Unsinger J, Burnham C-A, et al (2015) Interleukin-7 and anti-programmed cell death 1 antibody have differing effects to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Shock* 43:334–343. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000317>
335. Hotchkiss RS, Colston E, Yende S, et al (2019) Immune checkpoint inhibition in sepsis: a Phase 1b randomized study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of nivolumab. *Intensive Care Med* 45:1360–1371. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05704-z>
336. Hotchkiss RS, Colston E, Yende S, et al (2019) Immune checkpoint inhibition in sepsis: a Phase 1b randomized, placebo-controlled, single ascending dose study of anti-PD-L1 (BMS-936559). *Crit Care Med* 47:632–642. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003685>
337. Wu J, Zhou L, Liu J, et al (2013) The efficacy of thymosin alpha 1 for severe sepsis (ETASS): a multicenter, single-blind, randomized and controlled trial. *Crit Care* 17:R8. <https://doi.org/10.1186/cc11932>
338. Jianfeng W (2021) Long-term Prognosis After Thymosin Alpha 1 Treatment in Patients With Sepsis: A Multicenter Cohort Study. clinicaltrials.gov
339. Patil NK, Bohannon JK, Sherwood ER (2016) Immunotherapy: A Promising Approach to Reverse Sepsis-Induced Immunosuppression. *Pharmacol Res* 111:688–702. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.019>

340. Watanabe E, Thampy LK, Hotchkiss RS (2018) Immunoadjuvant therapy in sepsis: novel strategies for immunosuppressive sepsis coming down the pike. *Acute Med Surg* 5:309–315. <https://doi.org/10.1002/ams2.363>
341. Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Aosasa S (2018) Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis. *Ann Gastroenterol Surg* 2:351–358. <https://doi.org/10.1002/ags3.12194>
342. Delano MJ, Ward PA Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest* 126:23–31. <https://doi.org/10.1172/JCI82224>
343. Torres LK, Pickkers P, van der Poll T (2022) Sepsis-Induced Immunosuppression. *Annu Rev Physiol* 84:157–181. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-061121-040214>
344. Cavaillon J, Adib-conquy M, Fitting C, et al (2003) Cytokine Cascade in Sepsis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 35:535–544. <https://doi.org/10.1080/00365540310015935>
345. Tamayo E, Fernández A, Almansa R, et al (2011) Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *European Cytokine Network* 22:82–87. <https://doi.org/10.1684/ecn.2011.0281>
346. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, et al (2019) Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 5:18. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0>
347. Jacobs RF, Tabor DR, Burks AW, Campbell GD (1989) Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 140:1686–1692. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/140.6.1686>
348. McClintock D, Zhuo H, Wickersham N, et al (2008) Biomarkers of inflammation, coagulation and fibrinolysis predict mortality in acute lung injury. *Crit Care* 12:R41. <https://doi.org/10.1186/cc6846>
349. Cartin-Ceba R, Hubmayr RD, Qin R, et al (2015) Predictive value of plasma biomarkers for mortality and organ failure development in patients with acute respiratory distress syndrome. *Journal of Critical Care* 30:219.e1-219.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.09.001>
350. Dolinay T, Kaminski N, Felgendreher M, et al (2006) Gene expression profiling of target genes in ventilator-induced lung injury. *Physiol Genomics* 26:68–75. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00110.2005>
351. Xu Y, Meng C, Liu G, et al (2016) Classically Activated Macrophages Protect against Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury by Expressing Amphiregulin in Mice. *Anesthesiology* 124:1086–1099. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001026>
352. Confalonieri M, Salton F, Fabiano F (2017) Acute respiratory distress syndrome. *European Respiratory Review* 26:160116. <https://doi.org/10.1183/16000617.0116-2016>
353. Pechkovsky DV, Prasse A, Kollert F, et al (2010) Alternatively activated alveolar

- macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clin Immunol* 137:89–101. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.06.017>
354. Mora AL, Torres-González E, Rojas M, et al (2006) Activation of Alveolar Macrophages via the Alternative Pathway in Herpesvirus-Induced Lung Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:466–473. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0121OC>
355. Duru N, Wolfson B, Zhou Q (2016) Mechanisms of the alternative activation of macrophages and non-coding RNAs in the development of radiation-induced lung fibrosis. *World J Biol Chem* 7:231–239. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i4.231>
356. Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, et al (2009) Arginase-1-Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine-Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathog* 5:e1000371. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000371>
357. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>
358. Roquilly A (2020) Alveolar macrophages are epigenetically altered after inflammation, leading to long-term lung immunoparalysis. *Nature Immunology* 21:20
359. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF (2017) Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol* 39:517–528. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>
360. Keel M, Ecknauer E, Stocker R, et al (1996) Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma. *J Trauma* 40:907–912; discussion 912–914. <https://doi.org/10.1097/00005373-199606000-00008>
361. Millo JL, Schultz MJ, Williams C, et al (2004) Compartmentalisation of cytokines and cytokine inhibitors in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 30:68–74. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-2060-0>
362. Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA, Fowler AA (1991) Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 144:268–271. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/144.2.268>
363. Jorens PG, Van Damme J, De Backer W, et al (1992) Interleukin 8 (IL-8) in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS) and patients at risk for ARDS. *Cytokine* 4:592–597. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(92\)90025-m](https://doi.org/10.1016/1043-4666(92)90025-m)
364. Tran Van Nhieu J, Misset B, Lebargy F, et al (1993) Expression of tumor necrosis factor-alpha gene in alveolar macrophages from patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 147:1585–1589. https://doi.org/10.1164/ajrccm/147.6_Pt_1.1585
365. Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, et al (1996) Proinflammatory activity in bronchoalveolar

- lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1850–1856. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.153.6.8665045>
366. Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, et al (1994) Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 150:710–716. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.150.3.8087341>
367. Boujoukos AJ, Martich GD, Supinski E, Suffredini AF (1993) Compartmentalization of the acute cytokine response in humans after intravenous endotoxin administration. *Journal of Applied Physiology* 74:3027–3033. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.74.6.3027>
368. Nelson S, Bagby GJ, Dale D (2001) Cytokine treatment of bacterial pneumonia. *Semin Respir Infect* 16:38–46. <https://doi.org/10.1053/srin.2001.22727>
369. Jouan Y, Guillon A, Gonzalez L, et al (2020) Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. *J Exp Med* 217:e20200872. <https://doi.org/10.1084/jem.20200872>
370. Ronit A, Berg RMG, Bay JT, et al (2021) Compartmental immunophenotyping in COVID-19 ARDS: A case series. *J Allergy Clin Immunol* 147:81–91. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.09.009>
371. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, et al (2020) Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med* 8:1233–1244. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30404-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30404-5)
372. Heagy W, Nieman K, Hansen C, et al (2003) Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)* 4:171–180. <https://doi.org/10.1089/109629603766956960>
373. Monneret G, Gossez M, Aghaeepour N, et al (2019) How clinical Flow Cytometry rebooted sepsis immunology. *Cytometry A* 95:431–441. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23749>
374. Peronnet E, Venet F, Maucort-Boulch D, et al (2017) Association between mRNA expression of CD74 and IL10 and risk of ICU-acquired infections: a multicenter cohort study. *Intensive Care Med* 43:1013–1020. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4805-1>
375. Yende S, Kellum JA, Talisa VB, et al (2019) Long-term Host Immune Response Trajectories Among Hospitalized Patients With Sepsis. *JAMA Netw Open* 2:e198686. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.8686>
376. Bos LDJ, Scicluna BP, Ong DSY, et al (2019) Understanding Heterogeneity in Biologic Phenotypes of Acute Respiratory Distress Syndrome by Leukocyte Expression Profiles. *Am J Respir Crit Care Med* 200:42–50. <https://doi.org/10.1164/rccm.201809-1808OC>
377. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al (2012) Neutrophil Extracellular Traps

- Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLOS ONE* 7:e32366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366>
378. Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohé S, et al (2012) Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care* 16:R137. <https://doi.org/10.1186/cc11442>
379. Twaddell SH, Baines KJ, Grainge C, Gibson PG (2019) The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Respiratory Disease. *Chest* 156:774–782. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.06.012>
380. Bendib I, Beldi-Ferchiou A, Schlemmer F, et al (2021) Alveolar compartmentalization of inflammatory and immune cell biomarkers in pneumonia-related ARDS. *Crit Care* 25:23. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03427-y>
381. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int>. Accessed 22 Mar 2022
382. Rahman S, Montero MTV, Rowe K, et al (2021) Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 14:601–621. <https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1902303>
383. Schultze JL, Aschenbrenner AC (2021) COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* 184:1671–1692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.029>
384. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176:231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
385. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, et al (2009) Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 114:2619–2622. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-221606>
386. Moorthy AN, Rai P, Jiao H, et al (2016) Capsules of virulent pneumococcal serotypes enhance formation of neutrophil extracellular traps during in vivo pathogenesis of pneumonia. *Oncotarget* 7:19327–19340. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8451>
387. Yildiz C, Palaniyar N, Otulakowski G, et al (2015) Mechanical ventilation induces neutrophil extracellular trap formation. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 122:864–875
388. Bendib I, de Chaisemartin L, Granger V, et al (2019) Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients with Pneumonia-related Acute Respiratory Distress Syndrome. *Anesthesiology* 130:581–591. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002619>
389. Lögters T, Paunel-Görgülü A, Zilkens C, et al (2009) Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. *Journal of Orthopaedic Research* 27:1401–1407. <https://doi.org/10.1002/jor.20911>

390. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al (2014) Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 15:1017–1025. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>
391. Ebrahimi F, Giaglis S, Hahn S, et al (2018) Markers of neutrophil extracellular traps predict adverse outcome in community-acquired pneumonia: secondary analysis of a randomised controlled trial. *European Respiratory Journal* 51. <https://doi.org/10.1183/13993003.01389-2017>
392. Lefrançois E, Mallavia B, Zhuo H, et al (2018) Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. *JCI Insight* 3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98178>
393. Mikacenic C, Moore R, Dmyterko V, et al (2018) Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in the alveolar spaces of patients with ventilator-associated pneumonia. *Crit Care* 22:358. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2290-8>
394. Bendib I, de Chaisemartin L, Mekontso Dessap A, et al (2019) Understanding the Role of Neutrophil Extracellular Traps in Patients With Severe Pneumonia and ARDS. *Chest* 156:1278–1280. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.08.2179>
395. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, et al (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 15:623–625. <https://doi.org/10.1038/nm.1959>
396. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al (2011) Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA–Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Transl Med* 3:73ra19. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001180>
397. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al (2011) Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 187:538–552. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100450>
398. Yousefi S, Gold JA, Andina N, et al (2008) Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 14:949–953. <https://doi.org/10.1038/nm.1855>
399. Granger V, Faille D, Marani V, et al (2017) Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J Leukoc Biol* 102:775–781. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MA0916-411R>
400. Doster RS, Rogers LM, Gaddy JA, Aronoff DM (2018) Macrophage Extracellular Traps: A Scoping Review. *J Innate Immun* 10:3–13. <https://doi.org/10.1159/000480373>
401. Li H, Zhou X, Tan H, et al (2017) Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS. *Oncotarget* 9:1772–1784. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22744>
402. Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, et al (2011) Restoration of anti-*Aspergillus* defense by

- neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127:1243-1252.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.021>
403. Hue S, Beldi-Ferchiou A, Bendib I, et al (2020) Uncontrolled Innate and Impaired Adaptive Immune Responses in Patients with COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 202:1509–1519. <https://doi.org/10.1164/rccm.202005-1885OC>
 404. Yin K, Wilmanski J, Wang C, et al Lung Compartmentalization of Inflammatory Cells in Sepsis. 11
 405. Cavaillon J-M, Annane D (2006) Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 12:151–170. <https://doi.org/10.1179/096805106X102246>
 406. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, et al (1994) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5592–5596
 407. Bozinovski S, Jones J, Beavitt S-J, et al (2004) Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L877-885. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00275.2003>
 408. Han S, Mallampalli RK (2015) The Acute Respiratory Distress Syndrome: From Mechanism to Translation. *The Journal of Immunology* 194:855–860. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402513>
 409. Terpstra ML, Aman J, van Nieuw Amerongen GP, Groeneveld ABJ (2014) Plasma Biomarkers for Acute Respiratory Distress Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Critical Care Medicine* 42:691–700. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000435669.60811.24>
 410. Jouan Y, Baranek T, Si-Tahar M, et al (2021) Lung compartmentalization of inflammatory biomarkers in COVID-19-related ARDS. *Crit Care* 25:120. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03513-9>
 411. Cesta MC, Zippoli M, Marsiglia C, et al (2022) The Role of Interleukin-8 in Lung Inflammation and Injury: Implications for the Management of COVID-19 and Hyperinflammatory Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front Pharmacol* 12:808797. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.808797>
 412. Convertino I, Tuccori M, Ferraro S, et al (2020) Exploring pharmacological approaches for managing cytokine storm associated with pneumonia and acute respiratory distress syndrome in COVID-19 patients. *Crit Care* 24:331. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03020-3>
 413. Villar J, Herrán-Monge R, González-Higueras E, et al (2021) Clinical and biological markers for predicting ARDS and outcome in septic patients. *Sci Rep* 11:22702.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-02100-w>

414. Calfee CS, Ware LB, Glidden DV, et al (2011) Use of risk reclassification with multiple biomarkers improves mortality prediction in acute lung injury. *Crit Care Med* 39:711–717. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318207ec3c>
415. Zhao Z, Wickersham N, Kangelaris KN, et al (2017) EXTERNAL VALIDATION OF A BIOMARKER AND CLINICAL PREDICTION MODEL FOR HOSPITAL MORTALITY IN ARDS. *Intensive Care Med* 43:1123–1131. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4854-5>
416. Bime C, Casanova N, Oita RC, et al (2019) Development of a biomarker mortality risk model in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 23:410. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2697-x>
417. Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, et al (2004) Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes Cells* 9:165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00712.x>
418. Calfee CS, Ware LB, Eisner MD, et al (2008) Plasma receptor for advanced glycation end products and clinical outcomes in acute lung injury. *Thorax* 63:1083–1089. <https://doi.org/10.1136/thx.2008.095588>
419. Mauri T, Masson S, Pradella A, et al (2010) Elevated plasma and alveolar levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts are associated with severity of lung dysfunction in ARDS patients. *Tohoku J Exp Med* 222:105–112. <https://doi.org/10.1620/tjem.222.105>
420. Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, et al (2011) Increased levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and high mobility group box 1 (HMGB1) are associated with death in patients with acute respiratory distress syndrome. *Clin Biochem* 44:601–604. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.12.014>
421. Hagens LA, Heijnen NFL, Smit MR, et al (2021) Systematic review of diagnostic methods for acute respiratory distress syndrome. *ERJ Open Res* 7:00504–02020. <https://doi.org/10.1183/23120541.00504-2020>
422. Jones TK, Feng R, Kerchberger VE, et al (2020) Plasma sRAGE Acts as a Genetically Regulated Causal Intermediate in Sepsis-associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 201:47–56. <https://doi.org/10.1164/rccm.201810-2033OC>
423. Fremont RD, Koyama T, Calfee CS, et al (2010) Acute Lung Injury in Patients with Traumatic Injuries: Utility of a Panel of Biomarkers for Diagnosis and Pathogenesis. *J Trauma* 68:1121–1127. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181c40728>
424. Ware LB, Koyama T, Zhao Z, et al (2013) Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 17:R253. <https://doi.org/10.1186/cc13080>

425. Wenzel SE (2012) Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 18:716–725. <https://doi.org/10.1038/nm.2678>
426. Schivo M, Albertson TE, Haczku A, et al (2017) Paradigms in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Phenotypes, Immunobiology, and Therapy with a Focus on Vascular Disease. *J Investig Med* 65:953–963. <https://doi.org/10.1136/jim-2016-000358>
427. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, et al (2013) Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. *Physiol Rev* 93:1247–1288. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2012>
428. Bos LD, Schouten LR, van Vught LA, et al (2017) Identification and validation of distinct biological phenotypes in patients with acute respiratory distress syndrome by cluster analysis. *Thorax* 72:876–883. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209719>
429. Pickkers P, Kox M (2017) Towards precision medicine for sepsis patients. *Crit Care* 21:11. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1583-z>
430. Venet F, Demaret J, Gossez M, Monneret G (2021) Myeloid cells in sepsis-acquired immunodeficiency. *Ann NY Acad Sci* 1499:3–17. <https://doi.org/10.1111/nyas.14333>
431. Mengos AE, Gastineau DA, Gustafson MP (2019) The CD14+HLA-DRlo/neg Monocyte: An Immunosuppressive Phenotype That Restrains Responses to Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 10:1147. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01147>
432. Monneret G, Lepape A, Venet F (2011) A dynamic view of mHLA-DR expression in management of severe septic patients. *Crit Care* 15:198. <https://doi.org/10.1186/cc10452>
433. Herold S, Hoegner K, Vadász I, et al (2014) Inhaled Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor as Treatment of Pneumonia-associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 189:609–611
434. Bendib I, Beldi-Ferchiou A, Schlemmer F, et al (2021) Functional Ex Vivo Testing of Alveolar Monocytes in Patients with Pneumonia-Related ARDS. *Cells* 10:3546. <https://doi.org/10.3390/cells10123546>
435. del Fresno C, García-Río F, Gómez-Piña V, et al (2009) Potent Phagocytic Activity with Impaired Antigen Presentation Identifying Lipopolysaccharide-Tolerant Human Monocytes: Demonstration in Isolated Monocytes from Cystic Fibrosis Patients. *J Immunol* 182:6494–6507. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803350>
436. Morelli A, Del Sorbo L, Pesenti A, et al (2017) Extracorporeal carbon dioxide removal (ECCO2R) in patients with acute respiratory failure. *Intensive Care Medicine* 43:519–530. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4673-0>
437. Monaghan SF, Chung C-S, Chen Y, et al (2016) Soluble programmed cell death receptor-1 (sPD-1): a potential biomarker with anti-inflammatory properties in human and experimental acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Journal of Translational Medicine* 14:. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1071-x>

438. Lomas-Neira J, Monaghan SF, Huang X, et al (2018) Novel Role for PD-1:PD-L1 as Mediator of Pulmonary Vascular Endothelial Cell Functions in Pathogenesis of Indirect ARDS in Mice. *Front Immunol* 9:3030. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03030>
439. Poujol F, Monneret G, Pachot A, et al (2015) Altered T Lymphocyte Proliferation upon Lipopolysaccharide Challenge Ex Vivo. *PLoS One* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144375>
440. Zhang Y, Li J, Lou J, et al (2011) Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care* 15:R70. <https://doi.org/10.1186/cc10059>
441. Monneret G, Gossez M, Venet F (2016) Sepsis in PD-1 light. *Critical Care* 20:. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1370-x>
442. Erickson JJ, Lu P, Wen S, et al (2015) Acute viral respiratory infection rapidly induces a CD8+ T cell exhaustion-like phenotype. *J Immunol* 195:4319–4330. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403004>
443. Grimaldi D, Pradier O, Hotchkiss RS, Vincent J-L (2017) Nivolumab plus interferon- γ in the treatment of intractable mucormycosis. *The Lancet Infectious Diseases* 17:18. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30541-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30541-2)
444. Phares TW, Kotraiah V, Chung C-S, et al (2021) A PEPTIDE-BASED CHECKPOINT IMMUNOMODULATOR ALLEVIATES IMMUNE DYSFUNCTION IN MURINE POLYMICROBIAL SEPSIS. *Shock* 55:806–815. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001682>
445. van de Veerdonk FL, Giamarellos-Bourboulis E, Pickkers P, et al (2022) A guide to immunotherapy for COVID-19. *Nat Med* 28:39–50. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01643-9>
446. Huang I, Pranata R (2020) Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. *J Intensive Care* 8:36. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-00453-4>
447. Du R-H, Liang L-R, Yang C-Q, et al (2020) Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. *Eur Respir J* 55:2000524. <https://doi.org/10.1183/13993003.00524-2020>
448. Laing AG, Lorenc A, del Molino del Barrio I, et al (2020) A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med* 26:1623–1635. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1038-6>
449. Janssen NAF, Grondman I, de Nooijer AH, et al (2021) Dysregulated innate and adaptive immune responses discriminate disease severity in COVID-19. *J Infect Dis* jiab065. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab065>
450. Kreutmair S, Unger S, Núñez NG, et al (2021) Distinct immunological signatures discriminate severe COVID-19 from non-SARS-CoV-2-driven critical pneumonia.

451. Bost P, De Sanctis F, Canè S, et al (2021) Deciphering the state of immune silence in fatal COVID-19 patients. *Nat Commun* 12:1428. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21702-6>
452. Finigan JH, Downey GP, Kern JA (2012) Human Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47:395–404. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0100TR>
453. Huang C, Wang Y, Li X, et al (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395:497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
454. Chi Y, Ge Y, Wu B, et al (2020) Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China. *J Infect Dis* 222:746–754. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa363>
455. Yang Y, Shen C, Li J, et al (2020) Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* 146:119–127.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.027>
456. Kesmez Can F, Özkurt Z, Öztürk N, Sezen S (2021) Effect of IL-6, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL 10 levels on the severity in COVID 19 infection. *Int J Clin Pract* e14970. <https://doi.org/10.1111/ijcp.14970>
457. Lang FM, Lee KM-C, Teijaro JR, et al (2020) GM-CSF-based treatments in COVID-19: reconciling opposing therapeutic approaches. *Nat Rev Immunol* 20:507–514. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0357-7>
458. Bonaventura A, Vecchié A, Wang TS, et al (2020) Targeting GM-CSF in COVID-19 Pneumonia: Rationale and Strategies. *Front Immunol* 11:1625. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01625>
459. Huang K, Su I, Theron M, et al (2005) An interferon- γ -related cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol* 75:185–194. <https://doi.org/10.1002/jmv.20255>
460. Dunning J, Blankley S, Hoang LT, et al (2018) Progression of whole blood transcriptional signatures from interferon-induced to neutrophil-associated patterns in patients with severe influenza. *Nat Immunol* 19:625–635. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0111-5>
461. Shin H-S, Kim Y, Kim G, et al (2019) Immune Responses to Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus During the Acute and Convalescent Phases of Human Infection. *Clin Infect Dis* 68:984–992. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy595>
462. Ramasamy S, Subbian S (2021) Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 34:e00299-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00299-20>

463. Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, et al (2020) Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* 369:1210–1220. <https://doi.org/10.1126/science.abc6261>
464. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, et al (2020) Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell* 182:1401–1418.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.002>
465. Jeannet R, Daix T, Formento R, et al (2020) Severe COVID-19 is associated with deep and sustained multifaceted cellular immunosuppression. *Intensive Care Med* 46:1769–1771. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06127-x>
466. Kox M, Frenzel T, Schouten J, et al (2020) COVID-19 patients exhibit less pronounced immune suppression compared with bacterial septic shock patients. *Crit Care* 24:263. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02896-5>
467. Pannone G, Caponio VCA, De Stefano IS, et al (2021) Lung histopathological findings in COVID-19 disease – a systematic review. *Infect Agent Cancer* 16:34. <https://doi.org/10.1186/s13027-021-00369-0>
468. Middleton EA, He X-Y, Denorme F, et al (2020) Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood* 136:1169–1179. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007008>
469. Vasquez CR, Gupta S, Miano TA, et al (2021) Identification of Distinct Clinical Subphenotypes in Critically Ill Patients With COVID-19. *Chest* 160:929–943. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.04.062>
470. Chen H, Xie J, Su N, et al (2021) Corticosteroid Therapy Is Associated With Improved Outcome in Critically Ill Patients With COVID-19 With Hyperinflammatory Phenotype. *Chest* 159:1793–1802. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.11.050>
471. Pham T, de Prost N (2021) Clinical Subphenotypes in Critically Ill Patients With COVID-19. *Chest* 160:795–796. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.05.042>
472. Marcy TW, Merrill WW, Rankin JA, Reynolds HY (1987) Limitations of using urea to quantify epithelial lining fluid recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 135:1276–1280. <https://doi.org/10.1164/arrd.1987.135.6.1276>
473. Dargaville PA, South M, Vervaart P, McDougall PN (1999) Validity of markers of dilution in small volume lung lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 160:778–784. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.3.9811049>
474. Yu Y-RA, Hotten DF, Malakhau Y, et al (2016) Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 54:13–24. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0146OC>
475. Brittan M, Barr L, Morris AC, et al (2012) A novel subpopulation of monocyte-like cells in the human lung after lipopolysaccharide inhalation. *Eur Respir J* 40:206–214.

<https://doi.org/10.1183/09031936.00113811>

476. Thompson BT, Guérin C, Esteban A (2016) Should ARDS be renamed diffuse alveolar damage? *Intensive Care Medicine* 42:653–655. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4296-5>
477. Sinha P, Furfaro D, Cummings MJ, et al Latent Class Analysis Reveals COVID-19–related Acute Respiratory Distress Syndrome Subgroups with Differential Responses to Corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 204:1274–1285. <https://doi.org/10.1164/rccm.202105-1302OC>
478. Prescott HC, Calfee CS, Thompson BT, et al (2016) Toward Smarter Lumping and Smarter Splitting: Rethinking Strategies for Sepsis and Acute Respiratory Distress Syndrome Clinical Trial Design. *Am J Respir Crit Care Med* 194:147–155. <https://doi.org/10.1164/rccm.201512-2544CP>
479. Bos LDJ, Artigas A, Constantin J-M, et al (2021) Precision medicine in acute respiratory distress syndrome: workshop report and recommendations for future research. *Eur Respir Rev* 30:200317. <https://doi.org/10.1183/16000617.0317-2020>
480. Griffiths MJ, Evans TW (2005) Inhaled nitric oxide therapy in adults. *New England Journal of Medicine* 353:2683–2695
481. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, et al (2012) The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Medicine* 38:1573–1582. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2682-1>
482. Bouadma L, Mourvillier B, Deiler V, et al (2010) A multifaceted program to prevent ventilator-associated pneumonia: impact on compliance with preventive measures. *Crit Care Med* 38:789–796. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181ce21af>
483. Mekontso Dessap A, Katsahian S, Roche-Campo F, et al (2014) Ventilator-associated pneumonia during weaning from mechanical ventilation: role of fluid management. *Chest* 146:58–65. <https://doi.org/10.1378/chest.13-2564>
484. Gall J-RL, Lemeshow S, Saulnier F (1993) A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) Based on a European/North American Multicenter Study. *JAMA* 270:2957–2963. <https://doi.org/10.1001/jama.1993.03510240069035>
485. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, et al (1998) Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on “sepsis-related problems” of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 26:1793–1800
486. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al (2012) An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185:1004–1014. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0320ST>
487. Brown K, Brain S, Pearson J, et al (2006) Neutrophils in development of multiple organ

failure in sepsis. *The Lancet* 368:157–169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69005-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69005-3)