



HAL
open science

Hétérogénéité des réponses immunes post-septiques : approche translationnelle

Jean-François Llitjos

► **To cite this version:**

Jean-François Llitjos. Hétérogénéité des réponses immunes post-septiques : approche translationnelle. Immunologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP5096 . tel-04509723

HAL Id: tel-04509723

<https://theses.hal.science/tel-04509723v1>

Submitted on 18 Mar 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.

Université de Paris

École doctorale n°562 BioSPC

Laboratoire « Réponses immunitaires pulmonaires et systémiques au cours des infections bactériennes aiguës et chroniques », INSERM U1016

Hétérogénéité des réponses immunes post-septiques : approche translationnelle

Par Jean-François Llitjos

Thèse de doctorat d'immunologie

Dirigée par Frédéric Pène

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 24 juin 2021

Devant un jury composé de :

Rapporteur : Fabienne Venet, PU-PH, Université de Lyon

Rapporteur : Antoine Roquilly, PU-PH, Université de Nantes

Examinatrice : Florence Niedergang, DR, Université de Paris

Examineur: Antoine Guillon, PU-PH, Université de Tours

Examineur : Nicolas De Prost, PU-PH, Université de Paris-Est Créteil

Directeur de thèse : Frédéric Pène, PU-PH, Université de Paris



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

REMERCIEMENTS

Je souhaite apporter ici mes remerciements les plus sincères au Pr Frédéric Pène pour avoir accepté de m'encadrer pour la réalisation de ce travail. Son expérience et ses critiques m'ont permis d'apprendre et de progresser au cours de ce travail. Je le remercie pour ses conseils et pour sa volonté de favoriser le transfert des connaissances acquises en recherche clinique vers une recherche translationnelle.

Je souhaite également témoigner la profonde reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail :

Monsieur le Pr Antoine Guillon, qui me fait l'honneur de présider ce jury, et dont les connaissances dans le domaine de l'immunité pulmonaire ont permis d'élaborer des pistes de recherche innovantes.

Madame le Pr Fabienne Venet, qui a évalué en détail ce manuscrit de thèse et dont les qualités scientifiques et humaines sont une source d'inspiration. Je la remercie de sa relecture attentive et bienveillante de ce travail.

Monsieur le Pr Antoine Roquilly, qui a évalué ce travail en détail en y apportant son expertise dans le domaine de la réponse inflammatoire pulmonaire. Ses travaux récents ont été une source d'inspiration permanente. Je le remercie de sa relecture attentive et bienveillante de ce travail.

Madame le Dr Florence Niedergang, qui me fait l'honneur de prendre part à l'évaluation de ce travail, et dont le travail exceptionnel dans le domaine de la biologie des phagocytes a permis de mieux comprendre les relations étroites entre ces composants du système immunitaire et les infections.

Monsieur le Pr Nicolas de Prost, qui me fait l'honneur de prendre part à l'évaluation de ce travail, et dont l'importance des travaux cliniques et de recherche translationnelle ont permis une meilleure compréhension des pathologies pulmonaires et infectieuses en réanimation.

Je souhaiterais également témoigner ma très profonde reconnaissance au Dr Cédric Auffray et au Dr Bruno Lucas, avec qui j'ai réalisé une partie des expériences de cette thèse. Leur rigueur scientifique, leur expérience ainsi que leurs qualités humaines ont été d'une valeur inestimable au cours de ce travail. Je remercie ici aussi l'ensemble des membres de leur laboratoire au sens large.

Je souhaite remercier ici tous les membres de l'équipe du laboratoire « Réponses immunitaires pulmonaires et systémiques au cours des infections bactériennes aiguës et chroniques ». Je remercie plus particulièrement le Dr Maha Zohra Ladjemi, dont les conseils bienveillants et patients ont permis d'améliorer la qualité de ce travail. Je remercie aussi les Drs Edwige Péju et Zakaria Ait Hamou pour leur participation à certains aspects de ce travail au cours de leur Master 2 et dont la participation à leur encadrement a été un enseignement très riche. Enfin, je remercie monsieur Christophe Rousseau pour son aide logistique inestimable au sein du laboratoire.

De façon générale, je souhaite remercier ici tous les membres de l'Institut Cochin avec qui j'ai pris du plaisir à mener ce travail, et tout particulièrement Matthieu Bénard, Sébastien Jacques, Marcio Do Cruzeiro, le Dr Julie Guignot et Morgane le Gall. J'adresse toute mon amitié au Dr Samuel Bellais, dont les qualités scientifiques et humaines sont et resteront une source d'inspiration importante pour moi. Je remercie aussi l'ensemble des équipes de Bioaster avec lesquelles travailler sur un des aspects de ce travail a été un plaisir.

Enfin, je remercie les personnes qui ont su être à mes côtés et m'apporter leur soutien au cours de toutes ces années, Eva, Augustin, Gaëtan, ainsi que toute ma famille.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
SOMMAIRE.....	5
RESUME.....	7
ABBREVIATIONS.....	9
PROLEGOMENES.....	10
INTRODUCTION.....	13
I. Infection, sepsis et choc septique.....	13
A. Définition et origine.....	13
B. Choc septique : la conséquence d'une réponse inflammatoire excessive de l'hôte.....	14
a. L'activation du complément.....	15
b. Coagulation et activation des cellules endothéliales.....	17
II. Immunosuppression post-septique.....	18
A. Considérations historiques.....	18
B. Altérations du système immunitaire adaptatif.....	19
C. Altérations du système immunitaire innée.....	21
D. Modèles physiopathologiques du choc septique.....	23
E. Choc septique et pneumonie nosocomiales.....	26
a. Un risque accru d'infections nosocomiales dans le choc septique.....	26
b. Le poids des pneumonies nosocomiales dans le choc septique.....	27
III. Réponse immunitaire anti-infectieuse pulmonaire.....	28
A. Les pathogènes pulmonaires.....	28
B. La réponse immunitaire innée pulmonaire.....	29
a. Le macrophage alvéolaire, cellule clé de la réponse immunitaire pulmonaire.....	29
i. Considérations historiques.....	29
ii. Ontogénie des macrophages alvéolaires.....	30
iii. Fonctions anti-infectieuses des macrophages alvéolaires.....	33
b. La cellule épithéliale pulmonaire.....	35
c. Les autres acteurs de la réponse immunitaire innée pulmonaire.....	38
C. La réponse immunitaire adaptative pulmonaire.....	40
IV. Hétérogénéité des réponses immunitaires anti-infectieuses : compartmentalisation, tolérance et mémoire immunitaire innée.....	43
A. Le concept de compartmentalisation.....	43
B. Hétérogénéité des réponses immunitaires après une première infection : tolérance et mémoire immunitaire innée.....	45
a. Le phénomène de tolérance.....	45
b. Le concept de mémoire immunitaire innée.....	46
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	48
RESULTATS.....	50
I. Article 1 : Pulmonary infections prime the development of subsequent ICU-acquired pneumonia in septic shock.....	50
II. Article 2: Increased susceptibility to intensive care unit-acquired pneumonia in severe COVID-19 patients: a multicentre retrospective cohort study.....	61
III. Article 3: Pulmonary and non-pulmonary sepsis differentially modulate lung immunity towards secondary bacterial pneumonia: a critical role for the alveolar macrophage.....	70
IV. Article 4: Assessing the functional heterogeneity of monocytes in human septic shock: a proof-of-concept microfluidic assay of TNFα secretion.....	112
DISCUSSION.....	133

I. Autour de l'hétérogénéité du risque d'infections secondaires observée en pratique clinique	133
A. De potentiels facteurs de risque liés à la prise en charge.....	133
B. Un possible facteur de risque lié à la nature du pathogène.....	134
II. Autour des modifications phénotypiques des macrophages alvéolaires	137
A. Le niveau d'expression du CMH-II comme reflet de l'activation des macrophages alvéolaires.....	138
B. Le profil transcriptomique des macrophages alvéolaires.....	139
III. Autour des modifications quantitatives des macrophages alvéolaires	140
A. Provenance ontogénique des macrophages alvéolaires accumulés	140
B. Association entre macrophages alvéolaires et lymphocytes T régulateurs (Tregs)	141
C. La voie de signalisation du TLR2 contrôle l'expansion des lymphocytes Tregs	142
IV. Autour de l'exemple de la désactivation monocyttaire comme modèle d'investigation de l'hétérogénéité des réponses immunitaires.....	143
A. L'hypothèse des différences de stade développemental cellulaire	144
B. L'hypothèse du contrôle de l'activité cellulaire par le milieu	144
CONCLUSION.....	145
BIBLIOGRAPHIE	147

RESUME

Le sepsis consécutif à l'infection microbienne est une entité clinique complexe, caractérisée par la survenue simultanée d'une dysrégulation de la réaction inflammatoire initiale et d'une immunodépression associant des anomalies quantitatives et fonctionnelles des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. La plupart des dysfonctions immunitaires induites par le sepsis ont été associées à une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales, au premier rang desquelles les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM). Toutefois, il semble exister une variabilité dans la susceptibilité à ces infections acquises en réanimation. Dans un premier temps, nous avons identifié chez les patients pris en charge pour un choc septique un risque accru de PAVM dans les suites d'une première agression pulmonaire en comparaison des autres sites infectieux. Par ailleurs, dans le contexte pandémique, nous avons identifié que la COVID-19 était indépendamment associée à un risque accru de pneumonie nosocomiale, suggérant ainsi que l'infection à SARS-CoV-2 induit des altérations particulières de l'immunité pulmonaire. A l'aide de deux modèles murins d'infections pulmonaire (*pneumonie à E. coli*) et extra-pulmonaire (ligature ponction caecale, LPC) et de leurs contrôles respectifs (laparotomie simple et instillation de PBS), tous suivis d'une seconde pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* après 7 jours, nous avons pu mettre en évidence une différence de susceptibilité et de clairance bactérienne dans les suites d'une pneumonie secondaire à *P.aeruginosa* en fonction du site infectieux initial, ainsi que des modifications quantitatives et fonctionnelles des cellules immunitaires pulmonaires. En comparaison des souris ayant subi une laparotomie simple, les souris post-LPC ont une susceptibilité accrue à une pneumonie secondaire à *P. aeruginosa* avec une diminution de la clairance bactérienne et une mortalité plus importante (50% versus 0%, $p < 0.05$). A l'inverse, l'ensemble des souris ayant eu une pneumonie à *E. coli* a survécu à cette seconde pneumonie, avec une augmentation de la clairance bactérienne. L'évaluation de la composition cellulaire pulmonaire au 7^{ème} jour (avant la seconde pneumonie) a montré une diminution du nombre de macrophages alvéolaires (MA) chez les souris post-LPC et une augmentation chez les souris post-pneumonie. A l'inverse des MA post-LPC, les MA de souris post-pneumonie expriment fortement le CMH de classe II, ont une signature

transcriptomique orientée vers les défenses antibactériennes et stimulent la prolifération antigène-spécifique de lymphocytes T CD4. De plus, nous avons identifié une augmentation de la proportion des lymphocytes T CD4 régulateurs (Tregs) dans les poumons de souris post-LPC en comparaison des autres conditions, cette augmentation étant dépendante de la voie de signalisation du TLR2. La déplétion des Tregs préalablement à la survenue de la seconde pneumonie à *P. aeruginosa* par des anticorps bloquants dirigés contre le CD25 restaure la survie et la clairance bactérienne chez les souris post-LPC. Leur déplétion est aussi associée à une restauration du nombre et des fonctions des MA post-LPC. Compte-tenu des difficultés d'accès aux macrophages tissulaire en pratique clinique, nous avons évalué les fonctions des monocytes circulants à l'aide d'une technique expérimentale innovante basée sur l'encapsulation de cellules dans des gouttelettes lipidiques dans un système de microfluidique. Nous avons évalué en temps réel la sécrétion individuelle de TNF α par des monocytes de patients septiques (n=7) et de volontaires sains (n=10) exposés à une stimulation par LPS. En confrontant les résultats à ceux obtenus par cytométrie de flux (expressions membranaire de HLA-DR et intracellulaire de TNF α), nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une variabilité temporelle importante et d'une grande hétérogénéité des réponses monocytaires chez les patients septiques.

ABBREVIATIONS

CARS : Compensatory anti-inflammatory response
CCR2 : C-C chemokine receptor type 2
CLI : Cellules lymphoïdes innées
cMoP : Common monocyte progenitor
COVID-19 : Coronavirus Disease 2019
CPIS : Clinical Pulmonary Infection Score
DAMP : Damage-associated molecular patterns
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IFN γ : Interféron gamma
IL-1 : Interleukine-1
LPS : Lipopolysaccharide
MBL : Mannose Binding Lectins
MMP9 : Gelatinase B
MPO : Myéloperoxidase
NETs : Neutrophils extracellular traps
NF- κ B : Nuclear factor- κ B
NK : Natural killers
NLRs :NOD-like receptors
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PAVM : Pneumonies acquises sous ventilation mécanique
PMN-MDSC : Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells
PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PRR : Pattern Recognition Receptors
RAGE : Receptors for advanced glycation endproducts
RLRs :RIG-I-like receptors
RNA-Seq : RNA sequencing
SARS-CoV-2 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SRIS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique
TFPI : Tissue factor pathway inhibitor
TGF β : Transforming growth factor beta
TLRs : Toll-like receptors
TNF α : Tumor necrosis factor
Tregs : Lymphocytes T régulateurs
YS-EMP : Yolk Sac Erythro Myeloid Progenitor

PROLEGOMENES

L'être humain est en permanence exposé à de nombreux agents infectieux aux mécanismes de pathogénicité multiples et variés. Le système immunitaire a pour objectif le maintien de l'intégrité biologique de l'organisme et l'élimination de ces agents pathogènes, par le biais de mécanismes complexes plus ou moins spécifiques, et intimement liés. On distingue schématiquement deux types de réponse immunitaire : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative.

La réponse immunitaire innée fait intervenir un système de reconnaissance de motifs moléculaires conservés et partagés par plusieurs espèces pathogènes. Les mécanismes effecteurs sont peu spécifiques mais rapidement activés après contact avec l'agent pathogène. La réponse immunitaire adaptative met en jeu un système de reconnaissance hautement spécifique par des mécanismes de réarrangement génique. Elle se développe en plusieurs jours, permet une réponse plus efficace en cas de deuxième contact avec un agent pathogène et entraîne le développement d'une mémoire immunologique.

Le sepsis consécutif à l'infection microbienne est une entité clinique complexe, caractérisée par la survenue simultanée d'une dysrégulation de la réaction inflammatoire initiale et d'une immunodépression associant des anomalies quantitatives et fonctionnelles des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Chez des patients de réanimation considérés comme immunocompétents, la plupart des dysfonctions immunitaires induites par le sepsis ont été associées au pronostic et plus récemment à une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales dont les plus communes et les plus redoutées sont les pneumonies associées à la ventilation mécanique dues à des germes considérés comme peu virulents mais souvent multi-résistants aux antibiotiques.

Toutefois, il semble exister une variabilité dans la susceptibilité à ces infections acquises en réanimation. En effet, des données épidémiologiques récentes suggèrent que l'incidence et la mortalité attribuable des pneumonies nosocomiales pourrait varier selon le site infectieux initial (1,2). A ces observations

cliniques s'associent des données humaines montrant qu'il existe différents profils de réponses immunitaires dans les suites d'une première agression infectieuse (3,4). Ces différences sont aussi expérimentalement observées à l'échelle de l'organe, du tissu et des cellules (5,6).

L'approche physiopathologique actuelle du choc septique prend peu en compte la variabilité des réponses immunes anti-infectieuses. Nous formulons l'hypothèse qu'une exploration approfondie de telles variations ainsi que des mécanismes qui les sous-tendent pourrait permettre une meilleure compréhension de la variabilité des réponses à une infection sévère et participer à déterminer les phénotypes de patients les plus susceptibles de bénéficier de thérapies immunomodulatrices.

« Essentially all models are wrong, but some are useful »

Georges Box (1919 – 2013)

INTRODUCTION

I. Infection, sepsis et choc septique

A. Définition et origine

Très tôt dans l'histoire des maladies infectieuses, les praticiens se sont aperçus que le contact avec un individu malade pouvait transmettre la maladie. C'est dans le cadre de la recherche de la nature des agents transmissibles des maladies qu'une avancée majeure a été faite. En inoculant à des cochons d'Inde du *Vibrio cholerae* inactivé par la chaleur, Richard Pfeiffer (1858 – 1945), un bactériologiste allemand a identifié que les bactéries inactivées conservaient néanmoins une pathogénicité. Il a ainsi identifié un composé insoluble de la paroi membranaire bactérienne résistant à la chaleur : l'endotoxine. Retrouvée chez plusieurs bactéries, ce composé a été rapidement tenu pour responsable de la survenue des états de choc liés aux bactéries à Gram négatif (7), communément appelé dès lors choc endotoxinique. Après avoir observé que l'endotoxine était capable d'induire de la fièvre, il a ensuite été identifié la présence de microthrombi dans des modèles expérimentaux de choc endotoxinique. Toutefois, le lien entre activation de la cascade de la coagulation et infection n'a été possible que plus tard avec la découverte des cytokines dans les années 1970, les deux premières identifiées étant l'interleukine-1 (IL-1) (8) et le tumor necrosis factor (TNF α) (9).

Ainsi, l'interprétation physiopathologique du sepsis centrée sur le pathogène a progressivement évolué pour venir s'articuler autour d'un déséquilibre dans la réponse immunitaire de l'hôte. Par exemple, l'administration de TNF α humain recombinant reproduit les lésions tissulaires observées dans le choc endotoxinique, avec une mortalité comparable (10). De la même façon, l'administration d'IL-1 β recombinant humain à des lapins reproduit des résultats similaires, avec un effet synergique lorsqu'associé au TNF α (11). La compréhension que les manifestations systémiques observées au cours des infections peuvent être en rapport avec la synthèse de médiateurs de l'inflammation plutôt qu'en raison de la dissémination microbienne est à l'origine du concept moderne de sepsis (12). De fait, dans une première conférence de consensus de 1992 modifiée en 2001, le sepsis est défini

comme le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) induit par une infection, le choc septique étant la forme clinique caractérisée par une défaillance circulatoire avec une hypotension artérielle.

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

L'initiation de la réponse inflammatoire dans le sepsis, et à fortiori dans le choc septique, nécessite la reconnaissance des pathogènes. Celle-ci se fait par des récepteurs spécialisés qui peuvent reconnaître les agents pathogènes directement par des ligands spécifiques ou indirectement par des opsonines (**Figure 1**). L'identification directe des pathogènes se fait par des Pattern Recognition Receptors (PRR), membranaires ou cytoplasmiques, qui reconnaissent des motifs moléculaires hautement conservés et spécifiques des pathogènes : les Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) (13). Les PRR peuvent aussi reconnaître des composants issus de la dégradation cellulaire appelés damage-associated molecular patterns (DAMP). En fonction de leurs caractéristiques, les PRR peuvent déclencher à eux seuls la phagocytose (par exemple Dectin-1 qui lie les β -glucanes des organismes fongiques) ou alors déclencher les mécanismes effecteurs cellulaires. La localisation subcellulaire de ces récepteurs est adaptée à l'expression de leurs ligands à la surface du pathogène comme les composants de paroi et membrane, ou bien dévoilés par la phagocytose comme les acide nucléiques. Il existe trois grandes familles de PRR que sont les Toll-like receptors (TLRs), les RIG-I-like receptors (RLRs) et les NOD-like receptors (NLRs). La fixation du ligand sur le récepteur TLR induit une signalisation en cascade aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dépendante du facteur de transcription nuclear factor- κ B (NF- κ B). Ce facteur de transcription occupe une place toute particulière dans l'initiation de la réaction immunitaire initiale. Les RLRs sont une famille d'ARN-hélicases intracytoplasmiques essentielles pour la défense anti-virale. Enfin, la famille des NLRs comprend un grand nombre de récepteurs intracellulaires ayant un rôle crucial dans la formation du complexe protéique oligomérique intracellulaire de l'inflammasome puis l'activation des processus inflammatoires (14). Ensemble, ces récepteurs vont initier une cascade d'activations systémiques dont les trois principales dans le choc

septique sont 1/ l'activation du complément, 2/ l'activation des voies de la coagulation et 3/ l'activation des cellules endothéliales.

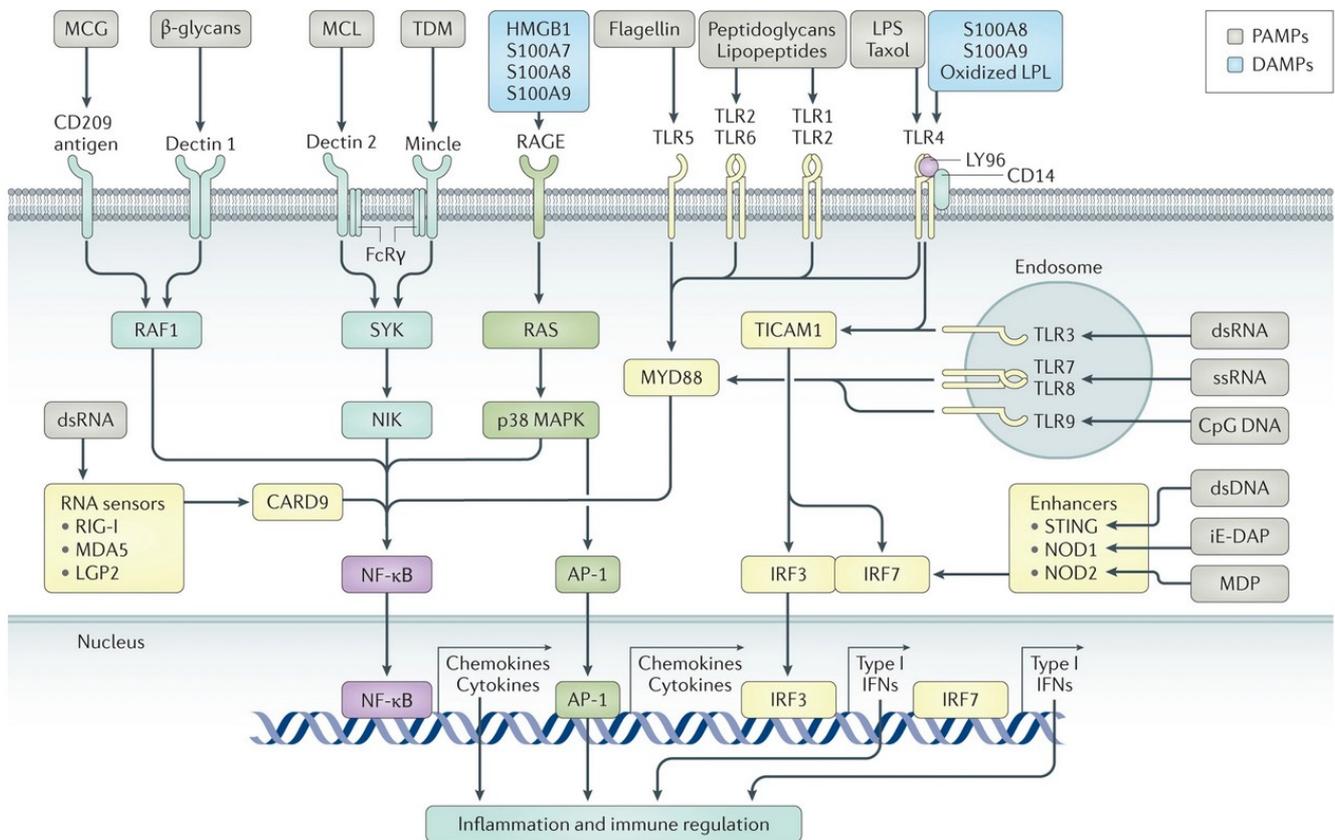


Figure 1 : Récepteurs membranaires et intracellulaires responsables de la reconnaissance des pathogènes (PAMP) et des signaux de dangers (DAMP). D'après (15).

a. L'activation du complément

Le complément est un système autonome d'une trentaine de protéines solubles ou membranaires. Les différentes protéines qui le composent sont des pro-enzymes inactives qui sont activées par clivage en cascade lors d'une interaction étroite avec une surface membranaire activatrice. Ce clivage libère une fraction ayant une activité enzymatique de protéase et un petit fragment soluble, qui possède souvent un rôle dans l'inflammation. Actuellement, trois voies d'activation du complément ont été décrites : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (**Figure 2**). La voie classique est déclenchée par la fixation du facteur C1q au fragment Fc des immunoglobulines IgG et IgM fixées à la surface des pathogènes, avec formation de C1r et C1s qui clivent les facteurs C2 et C4. La voie des lectines

est activée lors de la reconnaissance de résidus mannoses exprimés à la surface des pathogènes par les Mannose Binding Lectins (MBL). La voie alterne est quant à elle activée par une hydrolyse spontanée du fragment C3 (16). Si ces voies diffèrent par le mécanisme inducteur, elles convergent vers une voie finale commune par génération de la C3 convertase dont la fonction est de cliver le C3 en l'anaphylatoxine C3a et l'opsonine C3b. Se forment ensuite la C5 convertase puis le complexe d'attaque membranaire formé des facteurs C6, C7, C8 et C9 qui aboutit à la lyse des cellules cibles.

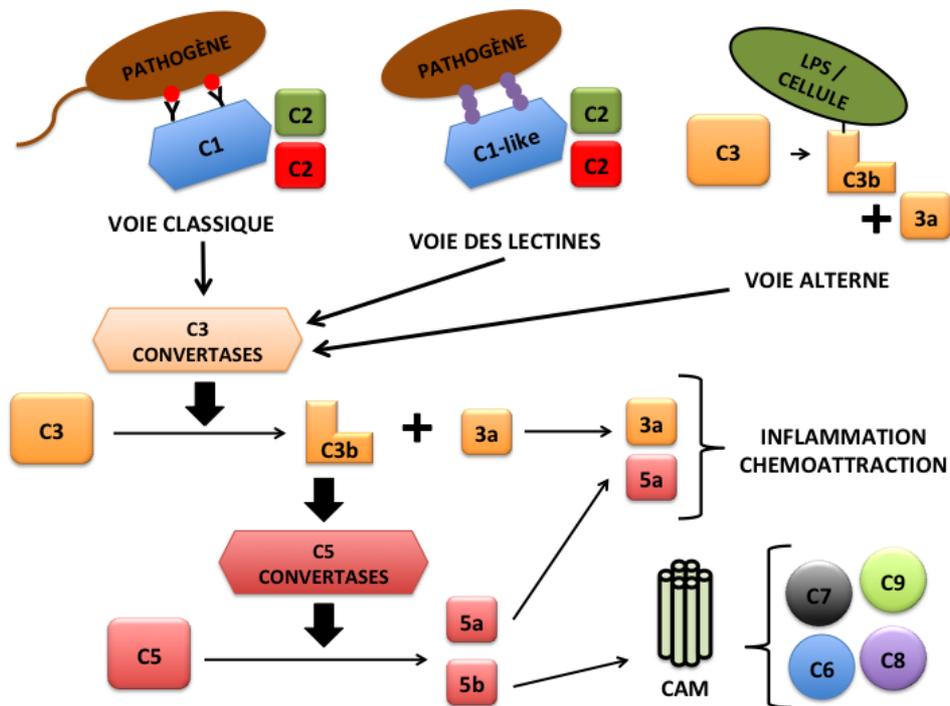


Figure 2 : Schéma du système du complément et de son rôle au sein du système immunitaire.

Le système du complément est constitué d'un grand nombre de protéines, dont plusieurs sont des protéases, interagissant les unes avec les autres pour opsoniser les pathogènes et induire et amplifier la réaction inflammatoire. Le système du complément peut-être activé par trois voies différentes que sont la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. *CAM* : *Complexe d'attaque membranaire* ; *LPS* : *lipopolysaccharide*

Le système du complément intervient à de multiples niveaux et participe à plusieurs fonctions importantes telles que 1/ l'opsonisation de certains agents pathogènes permettant leur phagocytose par les cellules effectrices, 2/ l'activation du système immunitaire par les fragments issus du clivage, 3/ la lyse cellulaire d'un agent pathogène et 4/ le métabolisme des complexes immuns circulants grâce aux récepteurs des fragments du complément. L'ensemble de ces fonctions requiert une

régulation fine, en particulier en cas d'activations multiples. Dans le contexte infectieux, et en particulier dans le cadre du choc septique, le type de voie activée ainsi que le moment auquel elle est engagée semblent être des facteurs déterminants d'un rôle protecteur ou délétère (17).

b. Coagulation et activation des cellules endothéliales

Une activation importante des voies de la coagulation est observée dans le sepsis, avec pour résultante la survenue d'une coagulation intravasculaire disséminée associant des microthrombi vasculaires et des hémorragies (**Figure 3**). Le facteur tissulaire occupe une place centrale dans l'activation de la coagulation et le développement de défaillances d'organes dans le choc septique (18). Parallèlement, de nombreuses données expérimentales et cliniques ont rapporté des altérations des réponses anticoagulantes de l'antithrombine, de l'inhibiteur du facteur tissulaire (Tissue factor pathway inhibitor, TFPI) et de système de la protéine C (18). L'activité pro-coagulante dans le choc septique se traduit par des dépôts de fibrine dans les micro-vaisseaux, une altération du glycocalyx et à des lésions endothéliales avec majoration de la perméabilité vasculaire.

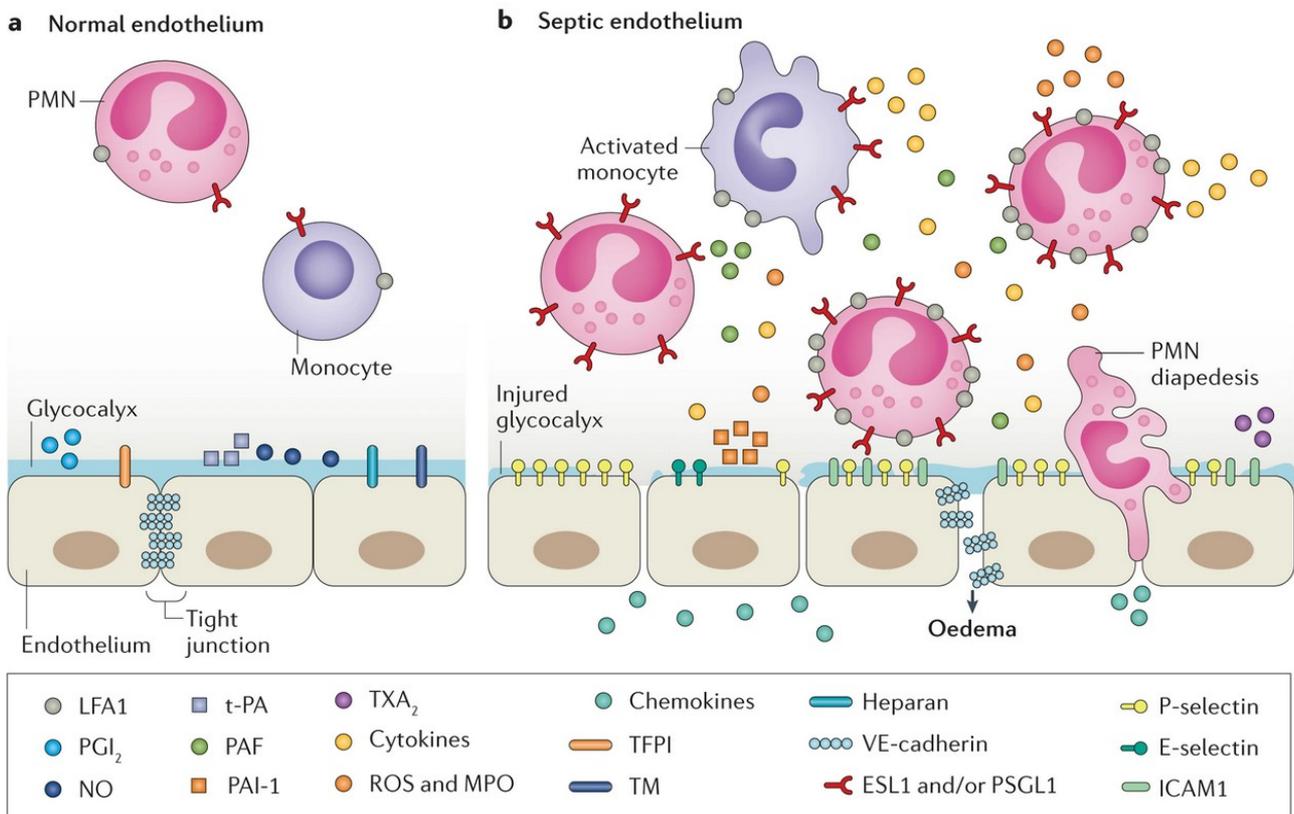


Figure 3 : Modifications de l'endothélium vasculaire dans les suites d'une infection, d'un état anticoagulant vers un état pro-coagulant. D'après (15).

Ainsi, le choc septique est responsable de lésions tissulaires au sein de différents organes, et est susceptible d'aboutir à une défaillance multiviscérale responsable des décès à la phase initiale. Cependant, la reconnaissance précoce de ce syndrome et les progrès de la réanimation ont permis de diminuer la mortalité précoce du choc septique. Les patients survivants à la phase initiale sont alors exposés à des infections nosocomiales grevées d'une importante morbi-mortalité, dans un contexte de dysfonction complexe du système immunitaire appelée immunosuppression post-septique.

II. Immunosuppression post-septique

A. Considérations historiques

Les premières données concernant les dysfonctions du système immunitaire chez le patient critique proviennent de la traumatologie et de la réanimation chirurgicale. En 1975, une équipe de chirurgiens et d'anesthésistes canadiens vont

observer anergie cutanée à la tuberculine chez un patient de 13 ans décédé d'une appendicite après 4 mois en réanimation. Devant un possible déficit de l'immunité, ils vont réaliser une greffe de peau d'un donneur HLA-incompatible non apparenté, qui ne va générer aucune réaction de rejet. Dans ce contexte, les auteurs vont évaluer l'hypersensibilité retardée à un test cutané chez 50 patients ayant un traumatisme ou un sepsis, et ont rapporté une anergie cutanée chez 26% des patients (19). L'apparition d'une anergie cutanée dans les suites d'une chirurgie en urgence était associée à l'apparition d'une infection secondaire dans 64% des cas (20). En 1983, en se basant sur les données observées chez les patients atteints du VIH au stade SIDA, Williams et coll. ont rapportés l'existence d'une déplétion lymphocytaire T CD4 et CD8 chez 146 patients pris en charge pour des infections. Des modèles expérimentaux vont mettre en évidence une apoptose massive lymphocytes T CD4 et CD8, avec un rôle central du TNF α (21). De façon intéressante, la persistance de ces anomalies était associée à une mortalité plus élevée.

B. Altérations du système immunitaire adaptatif

Dans la lignée des travaux précédemment décrits, cette déplétion lymphocytaire va être ensuite mise en évidence chez l'Homme, avec les travaux pionniers de R.S. Hotchkiss qui va montrer une déplétion en lymphocytes T CD4 et en lymphocytes B dans la rate de patients septiques par comparaison à des patients splénectomisés pour traumatisme (22) (**Figure 4**).

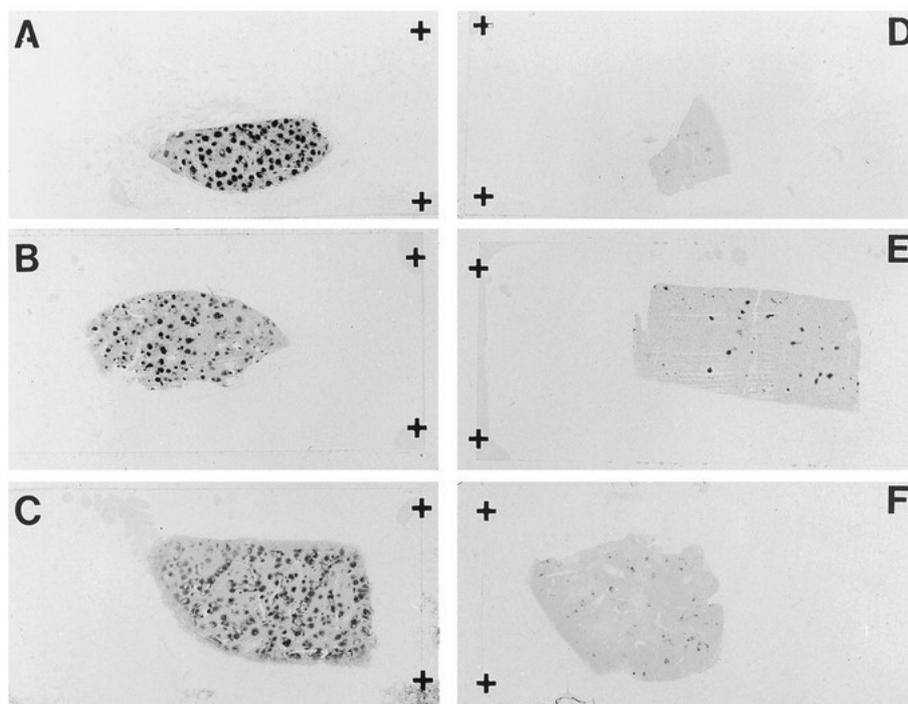


Figure 4 : Images sans grossissement de rates de patients splénectomisés dans le cadre d'un traumatisme (A,B et C) et de rates de patients en choc septique (D,E et F), marquée en immunohistochimie par le CD20 (identifiant les lymphocytes B), d'après (22).

De la même façon, la déplétion lymphocytaire va être mise en évidence dans le compartiment circulant, la persistance de la lymphopénie étant associée à la mortalité des patients septiques et à la survenue d'infections nosocomiales (23). Au delà de ces anomalies quantitatives, de nombreuses altérations des capacités fonctionnelles lymphocytaires ont été rapportées dans la littérature (**Figure 5**). Ainsi, il a été décrit une diminution du répertoire antigénique T chez les patients en choc septique, l'intensité de cette diminution étant associée à la mortalité et au risque d'infection nosocomiale (24). De plus, il a été montré une diminution de la capacité de sécrétion cytokinique à une stimulation par LPS ou au CD3/CD28 des lymphocytes spléniques de patients ayant un sepsis (25).

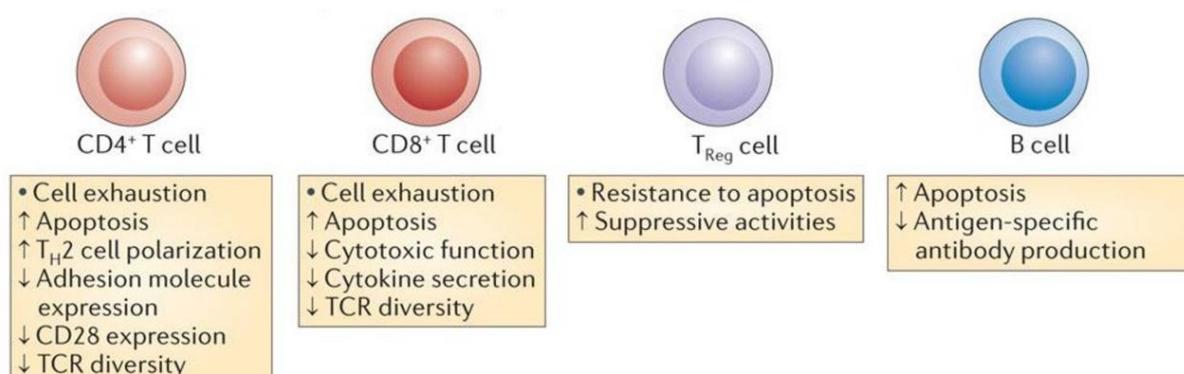


Figure 5 : Altérations post-septiques des cellules de l'immunité adaptative. D'après (26).

Parmi les populations lymphocytaires T, les lymphocytes T régulateurs (Tregs) représentent un sous-groupe d'intérêt en raison de leurs capacités immunosuppressives. De manière notable, ces cellules semblent préservées de l'apoptose induite par le sepsis, et sont alors caractérisées par une expansion relative (27,28), qui semble persister au long cours après la guérison du choc septique, avec un rôle central de l'IL-33 (29). Il est intéressant de noter que ces cellules semblent créer un environnement favorable à la progression tumorale dans les suites d'un sepsis (30). Ce résultat a ouvert des perspectives intéressantes concernant les complications à long terme post-septiques, telles que la survenue d'un cancer. Parallèlement à ces altérations lymphocytaires, il a été mis en évidence des altérations de cellules de l'immunité innée dans les suites d'un choc septique.

C. Altérations du système immunitaire innée

Des anomalies quantitatives et fonctionnelles des acteurs de la réaction immunitaire innée vont aussi être mis en évidence au cours du choc septique, à la fois dans le sang, dans la moelle osseuse mais aussi dans les organes distants.

C'est par le biais de l'investigation des mécanismes faisant intervenir les cytokines qu'a été faite une avancée importante dans le domaine de l'immunodépression post-septique. En effet, si les premières études font état d'une élévation précoces des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires (TNF α et l'IL-1) chez les patients septiques (31), d'autres travaux vont mettre en évidence une augmentation des quantité d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, dans le sang total de patients septiques (32). C'est dans le cadre de recherches visant à identifier la ou les cellules responsables de cette différence qu'ont été mis en évidence une atteinte fonctionnelle et phénotypiques des monocytes circulants. En effet, Munoz et coll. ont montré en 1991 une diminution de la capacité de sécrétion en IL-1, IL-6 et TNF α en réponse à une stimulation par LPS des monocytes circulants de patients en choc septique (33). En parallèle, l'expression de HLA-DR (appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité de type II, CMH-II) à la surface des monocytes est

diminuée chez les patients ayant un choc septique (34). Ce phénotype cellulaire est associé *in vitro* à une internalisation de HLA-DR faisant intervenir l'IL-10 et le GM-CSF (35,36). L'administration d'IFN γ permet de restaurer le niveau d'expression de HLA-DR à la surface des monocytes des patients en choc septique et possiblement d'améliorer le pronostic (37,38).

D'autres cellules présentatrices d'antigène présentent des altérations post-septiques (**Figure 6**). Par exemple, il a été mis en évidence une apoptose importante des cellules dendritiques spléniques (39) mais aussi circulantes (40). Par ailleurs, les cellules dendritiques survivantes dans le contexte post-septique présente une diminution de l'expression de l'appareil de présentation de l'antigène ainsi qu'une production accrue d'IL-10 après stimulation (41,42).

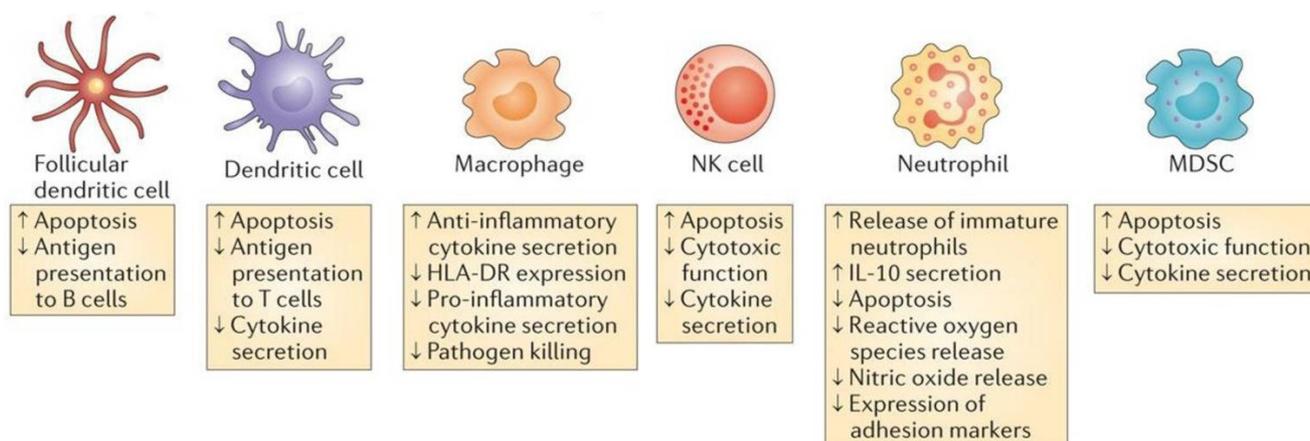


Figure 6 : Altérations post-septiques des cellules de l'immunité innée. D'après (26).

Les neutrophiles, autres cellules clés dans la réponse immunitaire innée, présentent des altérations dans les suites d'un choc septique. En effet, les neutrophiles des patients post-septiques présentent une diminution de leurs principales fonctions anti-infectieuses que sont le chimiotactisme et le relargage de granules cytolytiques (43). Ces anomalies ont été associées à un risque accru d'infections nosocomiales chez l'Homme (44). De façon remarquable, il a été décrit une augmentation de la proportion de neutrophiles immatures chez les patients septiques. Ces cellules sont caractérisées par un faible niveau d'expression du CD10 et du CD16 (CD10^{low} CD16^{low}), et leur expansion est associée à une augmentation de la mortalité chez les patients septiques (45). Il a été décrit un sous-groupe de polynucléaires identifiés par le phénotype CD16^{hi}, CD62L^{low} et capable d'inhiber la

prolifération lymphocytaire (46). Ces cellules immatures identifiées dans le sepsis présentent des similitudes avec les PMN-MDSC (*polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells*). Celles-ci sont des cellules granulocytiques phénotypiquement et morphologiquement proches des polynucléaires (CD11b⁺ CD14⁻ CD33⁺ CD15⁺ CD66⁺) mais avec des fonctions immunosuppressives (47). Elles sont augmentées dans le compartiment circulant des patients septiques (48) et leur expansion est associée à un risque accru d'infection nosocomiale (49). Ces deux populations sont difficiles à distinguer à l'heure actuelle, leur différenciation reposant sur le gradient de sédimentation par Ficoll.

Il apparaît donc que coexistent dans le choc septique à la fois des mécanismes pro-inflammatoires mais aussi anti-inflammatoires. De fait, ont été créés des modèles physiopathologiques visant à articuler l'état hyper inflammatoire et les altérations immunitaires innées et adaptatives observées au cours du choc septique.

D. Modèles physiopathologiques du choc septique

En 1996, compte-tenu de l'échec de plusieurs essais thérapeutiques visant à traiter la réponse inflammatoire excessive observée dans le sepsis (SIRS), R. C. Bone va proposer l'existence d'une réponse anti-inflammatoire compensatoire (*compensatory anti-inflammatory response*, CARS) (50). Ce modèle de réponse biphasique a été progressivement développé et adopté au cours des 20 dernières années. Ce modèle décrit le choc septique comme une réponse pro-inflammatoire initiale, dérégulée et responsable des défaillances d'organes à la phase initiale, rapidement suivie d'une réponse anti-inflammatoire compensatrice.

Bien que satisfaisant intellectuellement car associé la survenue plus fréquente d'infections nosocomiales dans les suites d'un choc septique, plusieurs éléments viennent remettre en question ce concept physiopathologique, notamment l'absence d'individualisation d'une phase immunosuppressive claire. Plusieurs analyses du profil transcriptomique des leucocytes circulants montrent qu'il n'existe pas de phase immunosuppressive individualisable et homogène chez les patients en choc septique (51). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont rapporté la détection simultanée de cytokines

pro et anti-inflammatoire à la phase initiale du choc septique (52,53). Enfin, des données expérimentales suggèrent que les cytokines peuvent exercer un effet protecteur ou délétère en fonction du délai par rapport à l'initiation du sepsis. Par exemple, l'inhibition de l'IL-10 dans les suites d'une péritonite polymicrobienne protège d'une infection secondaire à *Pseudomonas aeruginosa* dans un modèle murin (54). A l'inverse, l'administration d'anti-IL-10 préalablement à la réalisation d'une péritonite polymicrobienne entraîne une mortalité plus grande dans le même modèle murin (55). Ces données ont amené à reconsidérer ce modèle physiopathologique biphasique du choc septique.

Pendant longtemps, deux théories centrées sur la réponse de l'hôte ont été débattues (26). Un premier modèle, largement développé par les travaux de Richard S. Hotchkiss, reconnaît l'existence simultanée d'une phase pro et anti-inflammatoire à la phase précoce d'un choc septique et se fonde sur l'évolution clinique des patients (**Figure 7**). Ainsi, la mortalité précoce est expliquée par l'existence d'une réponse inflammatoire de l'hôte incontrôlée et dominante qui vient entraîner des lésions tissulaires irréversibles et une défaillance multi-viscérale. La mortalité tardive est elle expliquée par la survenue d'infections nosocomiales favorisées par l'existence d'une phase anti-inflammatoire prolongée (56). Une autre théorie a été avancée sur la base d'une étude de transcriptomique qui met en évidence l'existence d'une surexpression de gènes de la réponse immunitaire innée et une répression de l'expression des gènes de la réponse adaptative. Comme dans le premier modèle, la mortalité précoce est en lien avec des lésions tissulaires secondaires à une hyperactivation de l'immunité innée. En revanche, la mortalité tardive en lien avec les infections nosocomiales est expliquée par une réponse inflammatoire excessive et soutenue (57).

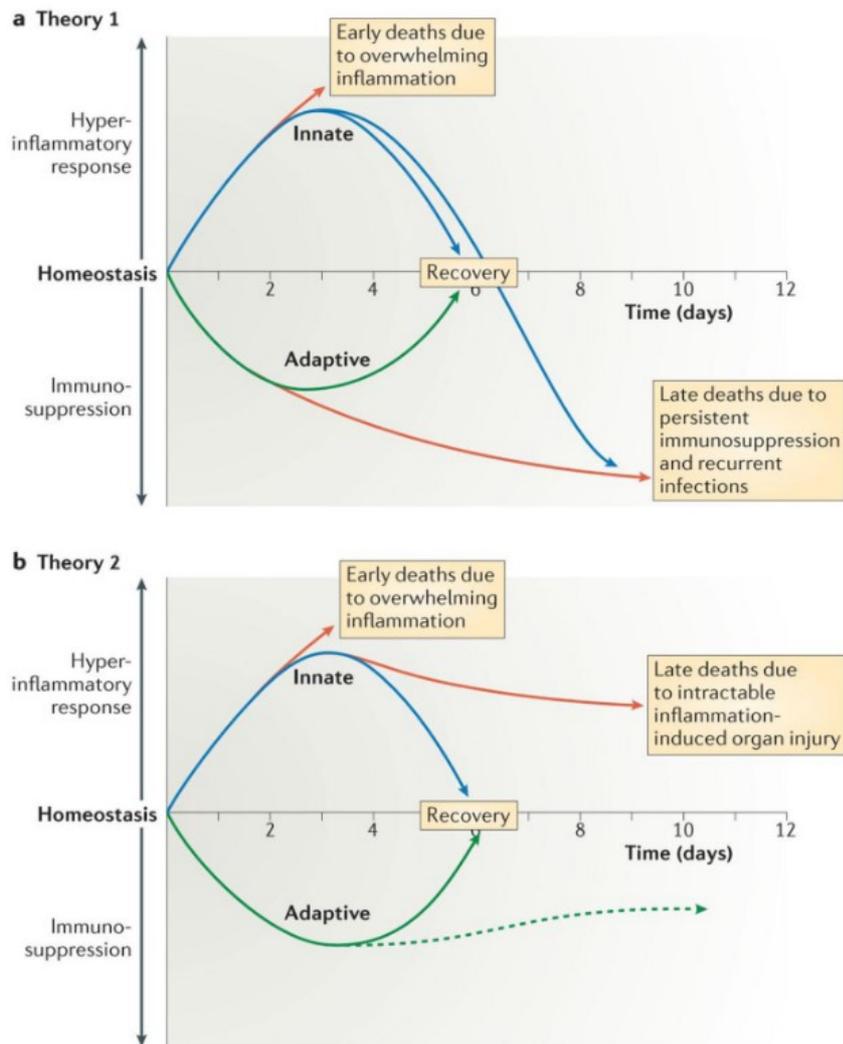


Figure 7 : Schéma représentant les deux modèles physiopathologiques actuels du choc septique, issu de (26).

Si ces deux modèles s'opposent sur le mécanisme, ils s'accordent néanmoins tous deux sur l'existence d'une mortalité tardive en lien avec les infections nosocomiales (**Figure 7**). En effet, l'amélioration des techniques de réanimation et la précocité de l'identification des patients en choc septique a fait reculer de façon significative la mortalité initiale. Les patients sont alors soumis à une réanimation prolongée et à un risque accru d'infections acquises en réanimation, au premier rang desquelles les pneumonie nosocomiales.

E. Choc septique et pneumonie nosocomiales

a. Un risque accru d'infections nosocomiales dans le choc septique

De façon générale, les patients admis en réanimation sont à risque de développer une ou plusieurs infections nosocomiales (1,58). Les taux d'incidence rapportés étaient de 8,4% en 2016 dans le rapport épidémiologique annuel du centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies (European center for disease prevention and control) (10) et 19,2% pour l'étude de prévalence européenne portant sur 310755 patients sur 1209 hôpitaux dans 28 pays entre 2016 à 2017 (59,60). Parmi les patients admis en réanimation, ceux pris en charge pour choc septique présentent un risque tout particulier de survenue d'infections secondaires. En 2015, une étude rétrospective monocentrique chez des patients pris en charge pour un choc septique montrait que les infections acquises en réanimation représentaient la première cause (20,4%) de mortalité tardive, si on fait abstraction de l'arrêt des thérapeutiques actives. Les facteurs de risques indépendants de mortalité tardive étaient l'âge élevé, la cirrhose, l'absence d'identification de pathogène et une corticothérapie antérieure (61). Toutefois, au-delà des facteurs liés aux patients et ceux en rapport avec la prise en charge, le choc septique *per se* entraîne des altérations des réponses immunes systémiques et régionales responsables d'une susceptibilité accrue aux infections secondaires.

Comme précédemment décrit, de nombreuses anomalies quantitatives et fonctionnelles de l'immunité innée mais aussi adaptative ont été rapportées dans le contexte du choc septique. Ces modifications ont été associées à un taux plus important de réactivation virale (62–64), dont la signification clinique reste débattue, ainsi qu'à une susceptibilité accrue aux infections bactériennes (65,66) et fongiques (67) opportunistes, les pathogènes impliqués étant habituellement peu virulents chez les patients immunocompétents. Toutefois, l'ensemble des données cliniques et expérimentales montre que le poumon semble être un organe à risque tout particulier d'infections nosocomiales dans les suites d'un choc septique.

b. Le poids des pneumonies nosocomiales dans le choc septique

Les pneumonies acquises en réanimation sont une cause fréquente d'infection nosocomiale. L'incidence rapportée dans la littérature des pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) varie entre 5% et 67% (68). Cette hétérogénéité peut être rapportée à la grande variabilité des populations étudiées mais aussi des critères diagnostiques. En effet, en absence d'examen de référence (« gold-standard ») permettant de porter le diagnostic, les PAVM sont uniquement suspectées sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques, par exemple en utilisant des scores tels que le CPIS (*Clinical Pulmonary Infection Score*). Celui-ci prend en compte la présence d'un nouvel infiltrat radiologique, de signes d'infection systémique (fièvre, numération leucocytaire altérée), une modification de l'aspect des sécrétions trachéo-bronchiques et la mise en évidence microbiologique d'un pathogène. Toutefois, il existe une variabilité inter-observateur dans l'appréciation de certains paramètres qui peut influencer le score et donc le diagnostic de PAVM.

La mortalité attribuable des PAVM est un autre sujet de controverse. En effet, si les infections pulmonaires secondaires ont été décrites comme responsables de la plus grande augmentation de mortalité parmi les infections nosocomiales (6,1% avec IC 95% 5,7%–6,5%), versus 3,2% pour les infections de cathéter veineux centraux, et 0,4% pour les infections du tractus urinaire (58), la mortalité attribuable des PAVM est difficile à préciser en raison d'un risque de biais d'analyse lié au temps. En effet, les patients en choc septique sont à risque de survenue d'un autre événement qui viendrait entraver l'observation de l'événement d'intérêt. Par exemple, dans notre cas, la survenue du décès en raison d'un autre motif qu'une pneumonie secondaire n'expose plus le patient au risque de pneumonie nosocomiale. Cependant, à partir de modèles statistiques d'analyse en risque compétitif, des études récentes ont rapporté une mortalité attribuable plus faible et variant entre 5,3% et 13 % dans le choc septique (69,70).

En outre, si de nombreux facteurs de risque de pneumonies nosocomiales liés au terrain sous-jacent, à la sévérité et au recours à des procédures invasives ont été identifiés, ceux-ci n'expliquent pas à eux seuls la variabilité inter-individuelle du

risque chez les patients en choc septique. Une piste d'investigation intéressante est l'environnement immunitaire pulmonaire. En effet, plusieurs éléments laissent à penser qu'il existe une hétérogénéité des modifications post-infectieuses de l'immunité pulmonaire, dont les déterminants restent à ce jour mal identifiés.

III. Réponse immunitaire anti-infectieuse pulmonaire

A. Les pathogènes pulmonaires

La survenue d'une pneumonie est définie par la survenue de lésions pulmonaires avec accumulation de liquide intra-alvéolaire en lien avec la présence d'un agent pathogène. Le rôle joué par ces derniers est mal compris et complexe. En premier lieu, il existe une grande variété d'agents responsables, avec fréquemment une absence d'identification de germes. Au sein d'une population de 2320 patients admis à l'hôpital pour pneumonies communautaires, 23% et 11% des agents identifiés étaient des virus et des bactéries, respectivement (71). Deuxièmement, plusieurs agents pathogènes peuvent être mis en évidence au sein du poumon, la part de responsabilité de chacun dans les lésions pulmonaires étant alors difficile et incertaine (**Figure 8**). Troisièmement, des données récentes montrent que le microbiote bactérien pulmonaire jouant un rôle important dans la survenue des pathologies infectieuses, auto-immunes et oncologiques (72,73). Enfin, force est de constater que certains patients vont développer un tableau clinique de pneumonie en présence d'une bactérie dans le poumon alors que d'autres non. Ainsi, bien que la nature du ou des agents pathogènes soit tout à fait importante, la réponse de l'hôte au pathogène participe activement à déterminer l'intensité et la sévérité du tableau clinique de pneumonie (**Figure 8**).

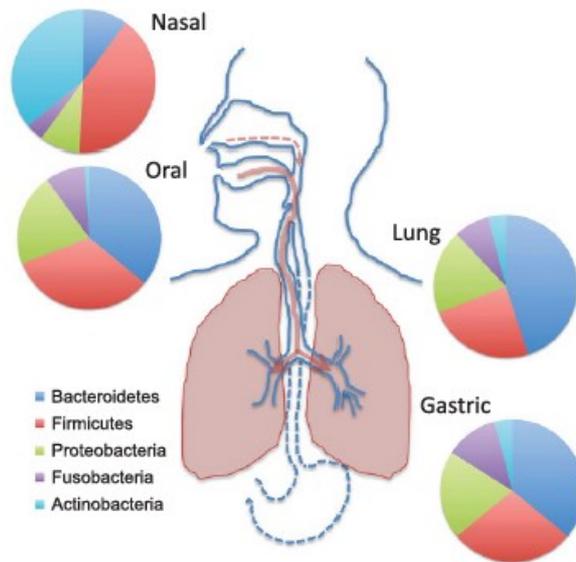


Figure 8 : Comparaison des microbiomes bactériens dans les voies aéro-digestives de patients sains. Les répartitions bactériennes sont exprimées à l'échelle des phylums. D'après (74).

B. La réponse immunitaire innée pulmonaire

Le système immunitaire inné correspond à un réseau de signaux et de cellules, hautement conservé au cours de l'évolution, dont une fonction principale est la reconnaissance d'agents pathogènes et l'induction précoce de mécanismes immunitaires visant à leur élimination. Si les voies respiratoires constituent une authentique barrière anatomique protectrice vis à vis de l'invasion des pathogènes respiratoires, une cellule se démarque tout particulièrement en raison de sa localisation à la surface alvéolaire et de ses fonctions immunitaires: le macrophage alvéolaire.

a. Le macrophage alvéolaire, cellule clé de la réponse immunitaire pulmonaire

i. Considérations historiques

S'il n'a pas été le premier à observer le mécanisme de phagocytose, Elie Metchnikoff a été le premier à relier ce phénomène à un processus d'homéostasie

tissulaire et de défense de l'hôte à une agression infectieuse (75). Il a défini une catégorie de cellules phagocytaires professionnelles incluant les neutrophiles (alors appelé « microphages ») ainsi que les phagocytes mononucléés (alors appelé « macrophages »). Depuis plus de 100 ans, la caractérisation de ces cellules phagocytaires a largement évolué et progressé, en particulier pour le système des phagocytes mononucléés qui inclut à la fois les monocytes et les macrophages. Jusqu'à récemment, les monocytes étaient perçus comme les précurseurs circulants des macrophages tissulaires. Néanmoins, des travaux récents viennent préciser les contours de cette filiation et apporter des niveaux de complexité supplémentaires.

ii. Ontogénie des macrophages alvéolaires

Le modèle classique est celui du renouvellement des macrophages tissulaires qui se fait par le pool de monocytes circulants. Cette conception hiérarchique a été formalisée dans les années 1970 en créant le système des phagocytes mononucléés. Dans ces travaux *princeps*, Van Furth et coll. vont identifier en utilisant un marquage à la thymidine-³H le promonocyte comme le précurseur médullaire commun aux monocytes et aux macrophages (76). En 2006, Vogg et coll. vont identifier une cellule médullaire CX₃CR1⁺ CD117⁺ et Lin⁻ appelé MDP (Macrophage and Dendritic cell Progenitor) capable de se différencier à la fois en monocyte, en cellule dendritique et en macrophage dans certains tissus (77). En 2013, Hettinger et coll. vont mettre en évidence l'existence d'un précurseur monocyttaire commun dérivant des MDP : la cMoP (common Monocyte progenitor), qui donne naissance aux sous-populations de monocytes Ly6C^{high} et Ly6C^{low}. La cMoP peut-être différenciée de la MDP par la perte d'expression de CD135 (78). L'ensemble de ces découvertes a été permis par l'identification de marqueurs phénotypiques de surface en cytométrie de flux. Une autre étape a été franchie grâce à l'analyse non supervisée des données obtenues en single-cell RNA-Seq (79), permettant la mise en évidence de combinaisons de facteurs transcriptionnels inconnus jusqu'alors (80).

En parallèle de ces avancées concernant la détermination de plus en plus précise des progéniteurs médullaires myéloïdes, de nombreux travaux ont été aussi menés pour mieux comprendre la dynamique de renouvellement des macrophages tissulaires. La traditionnelle conception hiérarchique du continuum entre les monocytes circulants et les macrophages tissulaires a été remise en question

récemment par des travaux montrant que les macrophages tissulaires disposent d'une capacité de renouvellement indépendante du contingent circulant des monocytes. Il convient toutefois de différencier l'état homéostatique de l'état inflammatoire pathologique, dans lequel les mécanismes mis en jeu peuvent différer.

Dans le cas des macrophages alvéolaires, l'ensemble des données disponibles suggère que les macrophages alvéolaires se renouvellent à l'état homéostatique avec une faible contribution du contingent circulant (**Figure 9**). En utilisant une stratégie de fate-mapping basée sur l'expression inductible ou constitutive de la recombinaise Cre dans les cellules exprimant CX₃CR₁, il a été montré que le renouvellement des macrophages alvéolaires est indépendant des monocytes circulants (81). En utilisant des modèles de souris parabionte qui partagent le compartiment circulant mais des organes différents, la contribution des cellules circulantes du donneur est minime chez le receveur dans les populations de macrophages alvéolaires (82–84). Ainsi, chez la souris naïve d'agression pulmonaire, le renouvellement des macrophages alvéolaires se fait essentiellement par auto-renouvellement du pool résident, avec une contribution minime voire nulle des monocytes circulants. Ces données ainsi que les progrès des stratégies de fate-mapping ont permis d'explorer la participation des précurseurs embryonniques dans l'ontogénie des macrophages alvéolaires adultes. Des travaux *princeps* ont montré que les macrophages alvéolaires sont issus d'un précurseur commun à de nombreux autres macrophages tissulaires et issu du sac vitellin embryonnaire : le YS-EMP (Yolk Sac Erythro Myeloid Progenitor). Cette cellule est identifiée (Csf1r⁺ Kit⁺ CD45^{low} AA4.1⁺) dans le sac vitellin au 8.5^{ème} jour embryonnaire (E8.5) puis se différencie en pré-macrophage (pMac) et colonise les tissus embryonnaires au 9.5^{ème} jour embryonnaire (E9.5) (85). Cette cellule apparaît aussi au niveau du foie foetal à E12.5, où elle se différencie aussi en pMac et en monocytes avant d'aller se localiser dans les tissus foetaux via la circulation (86). Ces monocytes foetaux sont retrouvés dans le poumon embryonnaire à partir de E14.5, où ils se différencient en macrophages alvéolaires immatures (pre-AM) identifiés par le phénotype de surface suivant : F4/80^{int} CD11b^{int} (86,87). Dans ce processus de différenciation intra-tissulaire de pré-AM en macrophage alvéolaire mature, le facteur de transcription PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ) joue un rôle crucial. Dans un modèle murin utilisant le système de recombinaison Cre-Lox et permettant la déplétion du facteur de transcription PPAR- γ au sein des macrophages ou des

cellules CD11c⁺, il a été montré que l'induction par le GM-CSF de ce facteur de transcription contrôle le développement des macrophages alvéolaires dans le poumon foetal (87). De plus, il a été montré que l'expression de PPAR- γ est dépendante du facteur épigénétique histone déacétylase de type III (HDAC3), qui vient moduler l'expression de ce facteur transcriptionnel et jouer un rôle clé dans le développement foetal et le renouvellement tissulaire des macrophages alvéolaires (88). Parallèlement au GM-CSF, une autre voie de signalisation passe par le TGF β , qui régule à la fois la différenciation mais aussi le maintien homéostatique des macrophages alvéolaires, avec une régulation autocrine (89).

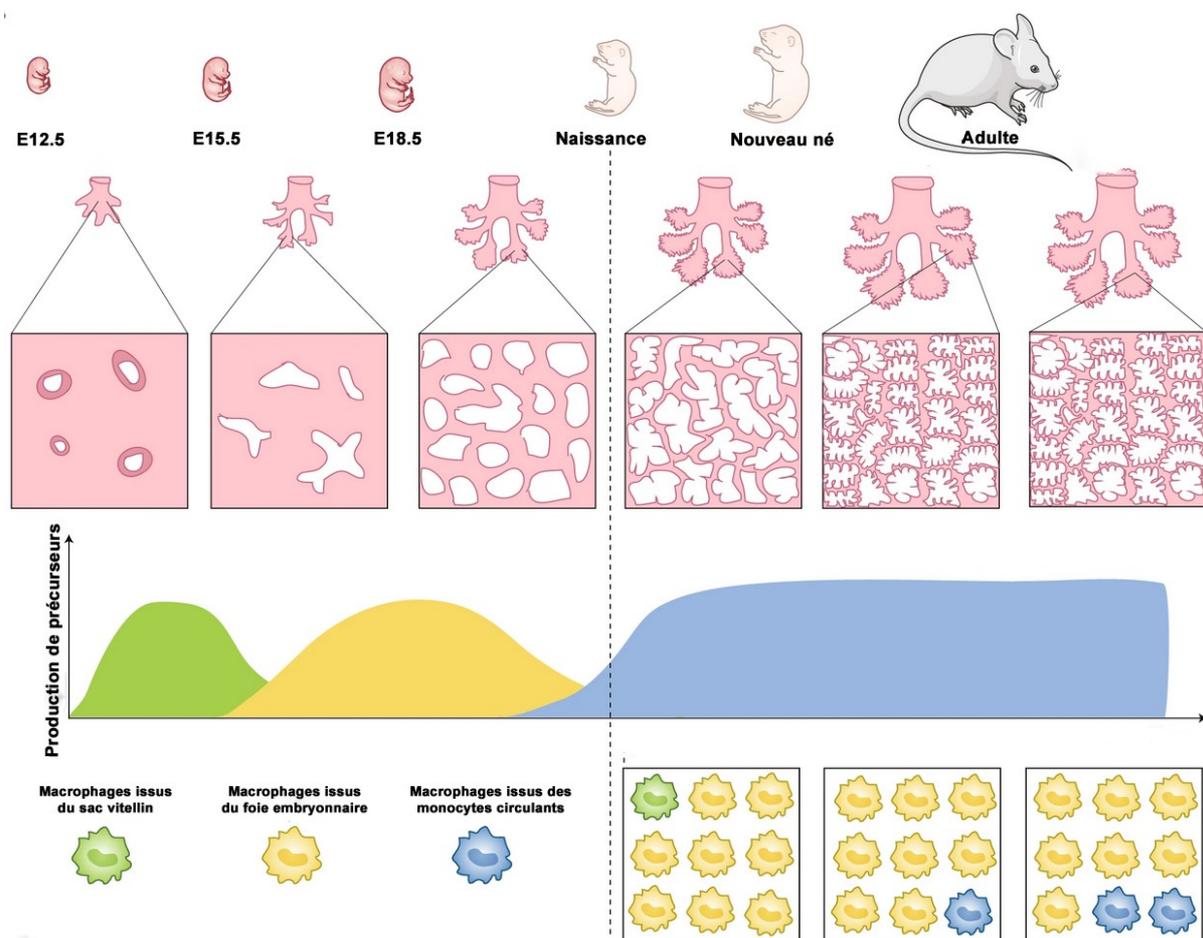


Figure 9 : Modèle actuel modélisant la dynamique ontogénique des macrophages alvéolaires. Adapté de (90).

Deux éléments importants sont à considérer dans l'homéostasie post-infectieuse des macrophages alvéolaires. D'une part, la majorité des données disponibles ont été obtenues à partir de modèles viraux, en particulier à partir de

modèles murins de grippe. D'autre part, plusieurs techniques sont utilisées pour évaluer l'origine des macrophages, grevées des limites intrinsèques propres. Ainsi, les données issues de la littérature sont extrêmement hétérogènes et d'interprétation complexe.

Dans des modèles murins, la détermination de l'origine des macrophages alvéolaires (renouvellement tissulaire ou recrutement de monocytes circulants) est explorée par le biais de deux grandes stratégies que sont 1/ l'utilisation de souris déficientes pour le C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) (souris *Ccr2*^{-/-}), et 2/ l'utilisation de chimères grâce à des souris exprimant des isotypes différents CD45.1 et CD45.2 du marqueur hématopoïétique CD45. Ainsi, dans des modèles d'infections virales respiratoires, plusieurs données suggèrent qu'il existe un recrutement pulmonaire de monocytes circulants, ces derniers exerçant un effet protecteur vis-à-vis d'une infection secondaire (91–93). Toutefois, une infection respiratoire par adenovirus entraîne la génération et la persistance de macrophages alvéolaires mémoires de façon indépendante des monocytes circulants (94). En utilisant une stimulation au LPS, les données expérimentales (95) et humaines (96) suggèrent un recrutement alvéolaire en monocytes circulants. A l'inverse, en utilisant des modèles infectieux bactériens, les données plaident en faveur d'un renouvellement assuré par les macrophages résidents pulmonaires. En utilisant le profil transcriptomique des macrophages tissulaires isolés après la survenue d'une péritonite polymicrobienne (CLP), il a été montré au sein du poumon (mais aussi dans le rein, le cœur et le foie) la dominance d'un programme de prolifération cellulaire (5). De façon similaire, à partir de modèles de pneumonies bactériennes (*E. coli* ou *S. aureus*) mais aussi virale, les macrophages alvéolaires développent un phénotype tolérant vis à vis d'une agression secondaire et sont maintenus dans les tissus sans contribution des monocytes circulants (97).

iii. Fonctions anti-infectieuses des macrophages alvéolaires

D'un point de vue fonctionnel, les macrophages alvéolaires oscillent entre deux grandes fonctions que sont le maintien de l'homéostasie tissulaire pulmonaire et l'immunité anti-infectieuse pulmonaire (**Figure 10**). Les macrophages alvéolaires représentent une première ligne de défense contre l'invasion de pathogènes respiratoires notamment par leur capacité de phagocytose.

A l'état homéostatique, les macrophages alvéolaires exercent des propriétés anti-inflammatoires par la phagocytose des cellules apoptotiques, des particules exogènes et du surfactant (98). Dans le cas d'une menace infectieuse pulmonaire, le macrophage polarise son activité vers des propriétés anti-infectieuses, au premier rang desquelles le processus de phagocytose pour former une vésicule phagosomale (99). La destruction du pathogène se fait alors par l'acidification progressive du phagolysosome et la synthèse de médiateurs cytolytiques que sont les radicaux libres (100). Parallèlement au processus de phagocytose, le mécanisme d'apoptose joue un rôle central dans la destruction des pathogènes par le macrophage alvéolaire (101). Ce processus de phagocytose peut-être déclenché à la fois par la reconnaissance de motifs moléculaires intra-cytosoliques mais aussi de cytokines via des récepteurs membranaires (102,103). Par ailleurs, d'autres voies de mort cellulaire que sont la nécroptose et la pyroptose ont été récemment mises en évidence, avec toutefois des éléments laissant à penser que ces mécanismes pourraient être délétères pour l'hôte en entraînant une réponse inflammatoire exacerbée (104). Par ailleurs, le macrophage alvéolaire est en mesure de déclencher et de coordonner le recrutement de cellules anti-inflammatoires au site infectieux par la production de cytokines et de chémokines avec un rôle central du facteur de transcription NF- κ B (105).

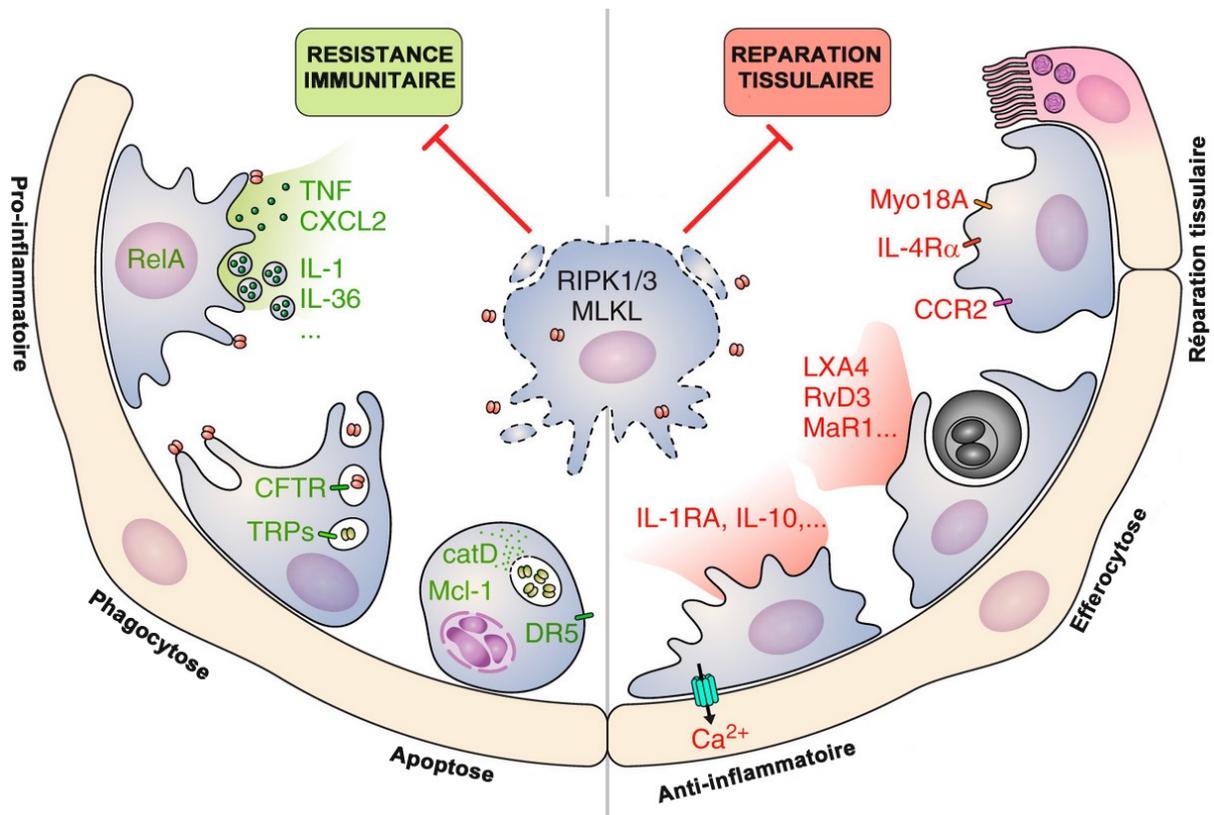


Figure 10 : Fonctions de défense immunitaire (résistance immunitaire) et de protection tissulaire (réparation tissulaire) des macrophages alvéolaires au cours d'une agression infectieuse. Adapté de (100). *TNF* : Tumor necrosis factor ; *CXCL2* : Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 ; *CFTR* : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ; *transient receptor potential channel* ; *catD* : cathepsine D ; *Mcl-1* : Induced myeloid leukemia cell differentiation protein ; *DR5* : Death receptor 5 (*TRAIL-R2*) ; *LXA4* : Lipoxine A4 ; *RvD3* : Resolvine D3 ; *MaR1* : Maresine 1.

b. La cellule épithéliale pulmonaire

Récemment, des travaux sont venus mettre en lumière le rôle joué par l'épithélium pulmonaire dans la réponse pulmonaire anti-infectieuse (**Figure 11**). Si les caractéristiques biophysiques de l'épithélium pulmonaire (synthèse des protéines A et D du surfactant, clairance muco-ciliaire) en font une barrière anatomique participant à assurer l'intégrité architecturale des poumons, celui-ci exerce aussi d'importantes fonctions immunomodulatrices et coordinatrices. On distingue schématiquement les cellules épithéliales de type I et de type II. Les cellules de type I constituent 98% de la surface totale des poumons et jouent un rôle central dans les échanges gazeux entre alvéoles et capillaires en raison de leur architecture caractérisée par une surface importante et une épaisseur fine. Les cellules de type II

exercent quant à elle des fonctions de synthèse du surfactant, de reconnaissance des pathogènes mais aussi expriment des régulateurs négatifs des macrophages alvéolaires.

Les cellules épithéliales pulmonaires de type II expriment à leur surface un large éventail de récepteur de l'immunité innée, tels que les Toll-Like receptors (TLR) ou les récepteurs RAGE (Receptors for advanced glycation endproducts) (106). Une fois activés par leurs ligands respectifs, ces récepteurs entraînent une activation de la protéine adaptatrice MyD88 et du facteur de transcription NF- κ B (107,108). Une autre voie d'activation des cellules épithéliales pulmonaires passe par la reconnaissance de cytokines sécrétées dans le milieu (**Figure 11**). Parmi celles-ci on peut notamment citer l'interleukine 22 (IL-22) et l'IL-17 produites par les lymphocytes CD4+ TH17. L'IL-22 entraîne la synthèse du peptide antimicrobien lipocaline-2 par l'épithélium (109) alors que l'IL-17 induit la sécrétion de la chémokine CXCL5 permettant un afflux de neutrophiles au site de l'infection (110).

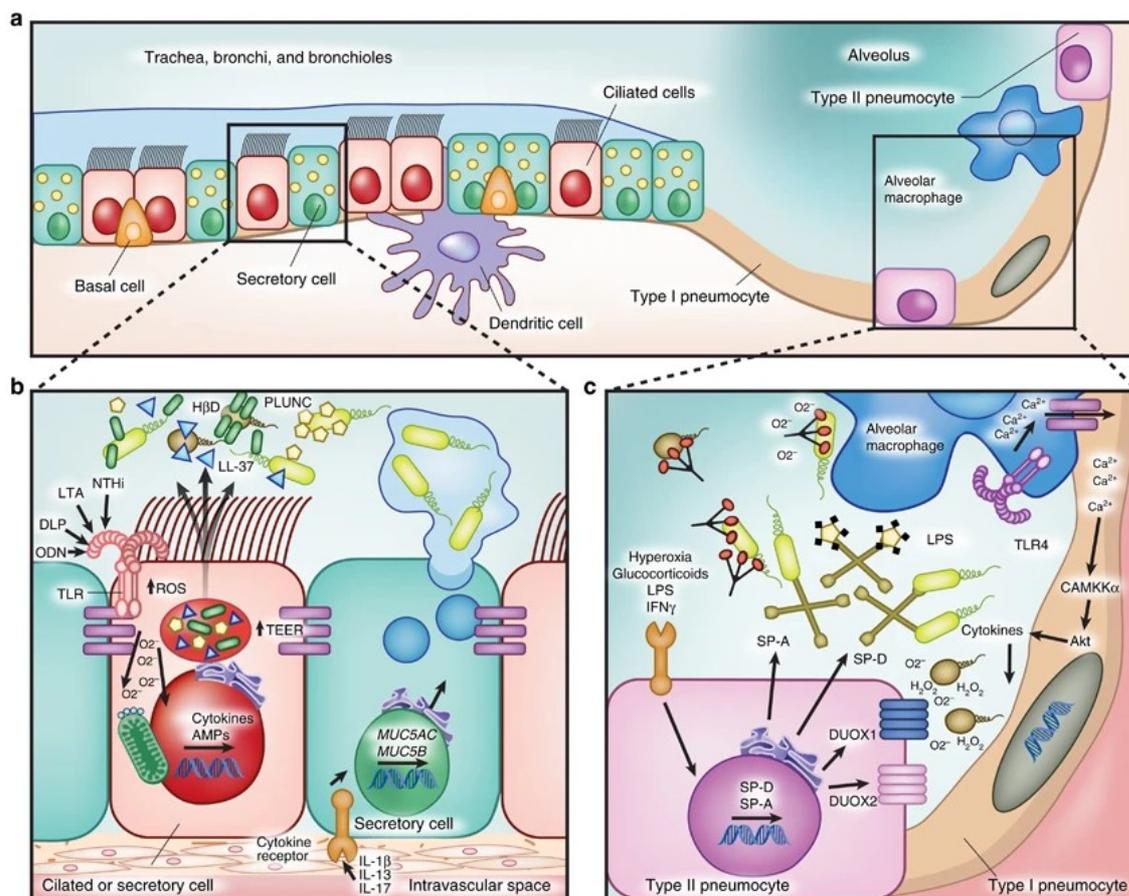


Figure 11 : Mécanismes de défense anti-infectieux de l'épithélium pulmonaire. D'après (111). LTA, lipoteichoic acid; DLP, diacylated lipopeptides; H β D, human β -defensin; NTHi, non-typeable Haemophilus influenza; ODN, oligodeoxynucleotide; ROS, reactive oxygen species; SP, surfactant protein; TLR, Toll-like receptor; TEER, transepithelial electrical resistance.

En sus de ces fonctions antibactériennes, l'épithélium pulmonaire intervient dans la régulation de l'état d'activation des macrophages alvéolaires qui résident au sein du mucus alvéolaire et sont en contact étroit avec les cellules épithéliales de type I et de type II (**Figure 12**). Dans le cadre de ces interactions cellulaires, le couple ligand-récepteur CD200-CD200R est d'intérêt tout particulier. CD200 est exprimé à la surface luminale des cellules épithéliales respiratoires et se lie au CD200R exprimé à la surface des macrophages alvéolaires. La délétion en CD200 chez des souris entraîne à la fois une prolifération des macrophages alvéolaires mais aussi une plus grande susceptibilité à une infection par le virus de la grippe (112). Un autre mécanisme de régulation met en jeu le TGF β , dont la fixation à l'intégrine $\alpha\beta 6$ située sur les cellules épithéliales entraîne des changements conformationnels facilitant l'interaction avec les récepteurs au TGF β à la surface des macrophages alvéolaires (113). Cette interaction est suivie d'une activation des voies de signalisation dépendantes de SMAD activant ou inhibant les macrophages alvéolaires. L'épithélium alvéolaire est aussi une source importante de GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), dont l'absence résulte en une accumulation de surfactant au sein des poumons, les macrophages alvéolaires étant alors incapables de dégrader les protéines et les lipides du surfactant. Le facteur de transcription PU.1 a été identifié comme jouant un rôle central dans la régulation des effets du GM-CSF au sein du macrophage alvéolaire (114). Enfin, Les macrophages alvéolaires qui peuvent interagir avec l'épithélium alvéolaire par un mécanisme original de canaux de connexine-43 qui permettent la communication intercellulaire par dépolarisations synchrones Ca⁺⁺-dépendantes (115).

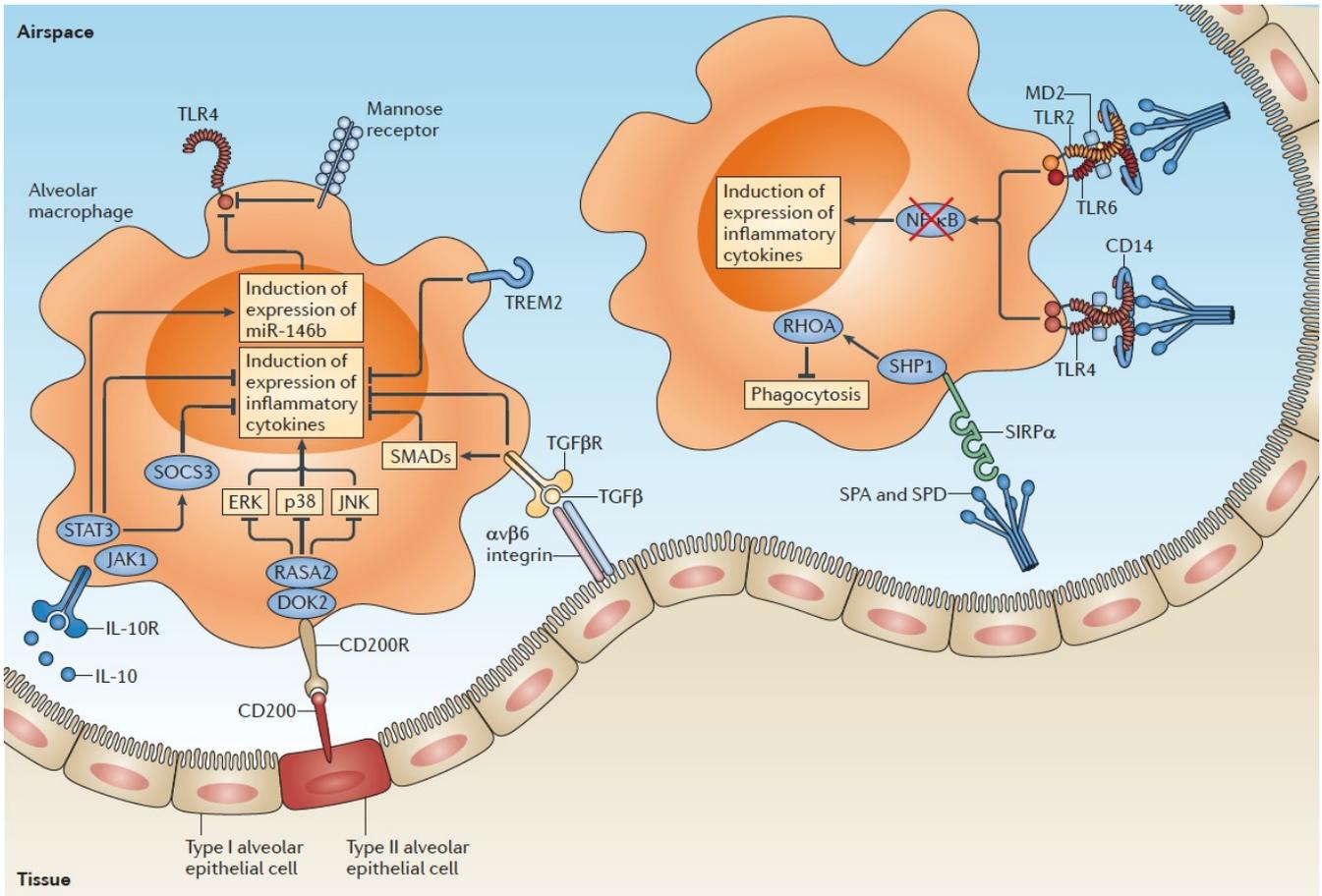


Figure 12 : Régulation de l'état d'activation des macrophages alvéolaires par l'épithélium pulmonaire. Issu de (98).

Si les interactions entre macrophages alvéolaires et épithélium respiratoire dans les suites d'une agression infectieuse visent à la régulation fine de l'intensité de la réponse inflammatoire, une finalité importante de ces échanges est le recrutement au site infectieux de cellules immunitaires, dont l'archétype est le polynucléaire neutrophile.

c. Les autres acteurs de la réponse immunitaire innée pulmonaire

Les mécanismes qui gouvernent le recrutement des polynucléaires neutrophiles au site infectieux pulmonaire sont multiples, avec un rôle central joué par les TLR et les gradients de chémokines (116). L'arrivée rapide de ces cellules au site infectieux est favorisée par l'existence d'une grande quantité de polynucléaire neutrophiles à la paroi des vaisseaux pulmonaires (117). Un fois leur migration intra-alvéolaire achevée, ils exercent un effet antimicrobien par le biais des mécanismes

principaux de phagocytose et de dégranulation. Le principe de la destruction bactérienne par phagocytose repose sur le même mécanisme que celui des macrophages alvéolaires. La dégranulation correspond à l'émission dans le milieu extracellulaire de granules toxiques contenant de la myéloperoxidase (MPO), de la gelatinase B (MMP9), des cathepsines et des défensines (118). Enfin, il a été décrit récemment l'émission par les neutrophiles activés de fibres extracellulaires composées d'un mélange d'ADN, d'histones, de protéines et/ou d'enzymes lytiques appelés NETs (Neutrophils extracellular traps) qui peuvent immobiliser les pathogènes, ainsi contenir la dissémination de l'infection et favoriser leur élimination (119,120).

Une population cellulaire a bénéficié d'un intérêt considérable depuis quelques années : les cellules lymphoïdes innées (CLI). Il s'agit d'une population cellulaire caractérisée par une morphologie de cellules lymphoïdes mais dépourvue d'expression des principaux marqueurs de surface des lignées lymphocytaires T et B et impliqués dans la réponse immunitaire anti-infectieuse et dans la réparation des dommages tissulaires (121,122). Actuellement, les CLI sont divisées en trois sous-groupes : les CLI de type 1, incluant les cellules NK (natural killers), qui produisent de l'IFN- γ , les CLI de type 2, qui produisent de l'IL-9 et de l'IL-13, et qui ont un rôle dans le maintien de l'intégrité tissulaire, les CLI de type 3 qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et jouent un rôle dans la réponse immunitaire innée contre les bactéries extracellulaires. Si les cellules NK jouent un rôle particulier dans la reconnaissance et la dégradation de cellules de l'hôte infectées par les virus, des données récentes viennent mettre en lumière leur rôle joué dans les infections bactériennes pulmonaires (100). Elles exercent leur fonction effectrice de cytotoxicité par le biais de deux principaux mécanismes : l'exocytose de protéines lytiques de paroi (perforine et granzyme) et l'induction de l'apoptose par la voie caspase-dépendante. La régulation des fonctions effectrices cytotoxiques des cellules NK nécessite un équilibre finement régulé entre des signaux afférents activateurs et inhibiteurs. Ces signaux sont intégrés via des récepteurs transmembranaires qui exercent une fonction activatrice ou inhibitrice en fonction du ligand reconnu. On distingue en particulier les Killer cell Ig-like Receptors (KIR) qui reconnaissent spécifiquement les molécules du CMH de classe I et le récepteur pour le fragment Fc des IgG (Fc γ RIIIA ou CD16), qui intervient dans le phénomène de cytotoxicité dépendante des anticorps par opsonisation. Les CLI de type II sont retrouvées dans

le poumon à l'état homéostatique. Leur rôle exact dans les mécanismes de défense pulmonaire et/ou de régénération tissulaire reste à déterminer (123). Les CLI de type III représentent une de source principale d'IL-17 dans le poumon en réponse à une agression bactérienne (100). Enfin, le rôle des plaquettes a aussi été identifié dans la réponse immunitaire innée pulmonaire. Elles participent au recrutement des polynucléaires neutrophiles au site infectieux (124) et leur activation excessive a été identifiée comme un facteur délétère dans les infections par le virus de la grippe (125).

C. La réponse immunitaire adaptative pulmonaire

Le système immunitaire adaptatif, composé d'une immunité à médiation humorale et d'une immunité à médiation cellulaire, joue également un rôle majeur dans la réponse anti-infectieuse pulmonaire. Dans le cadre de la pandémie de COVID-19, les essais d'utilisation de sérum de patients convalescents et l'importance de la vaccination illustre bien le rôle central de l'immunité adaptative à médiation humorale dans la réponse anti-infectieuse pulmonaire. Par ailleurs, la survenue d'infections opportunistes à *Pneumocystis jirovecii* chez les patients VIH ayant une déplétion en lymphocytes T CD4+ confirme l'importance de son pendant cellulaire. L'objectif de la réponse immunitaire adaptative vise au développement d'une immunité acquise spécifique dirigée contre le pathogène (immunité homotypique) mais aussi contre des pathogènes similaires mais non identiques (immunité hétérotypique). Les principaux acteurs de cette réponse sont les lymphocytes T et B.

Les lymphocytes T expriment un récepteur membranaire hautement polymorphique permettant une grande spécificité antigénique, le TCR $\alpha\beta$ (T cell receptor) et des molécules CD3 qui viennent s'assembler avec le TCR pour former un complexe TCR-CD3. On distingue deux grandes sous-populations de lymphocytes T : les lymphocytes T CD8 cytotoxiques et les lymphocytes T CD4, dont l'orientation fonctionnelle est signée par leur profil de sécrétion cytokinique et des facteurs de transcription spécifiques (**Figure 13**). Parallèlement à cette définition fonctionnelle, il existe une distinction basée sur les capacités de migration des lymphocytes T CD4+, qui isole les T_{RM} (résident mémoire, résident dans un tissu)

des T_{EM} (effecteurs mémoire, circulant dans le sang et le réseau lymphatique) et des T_{CM} (centraux mémoire, non circulants) (126).

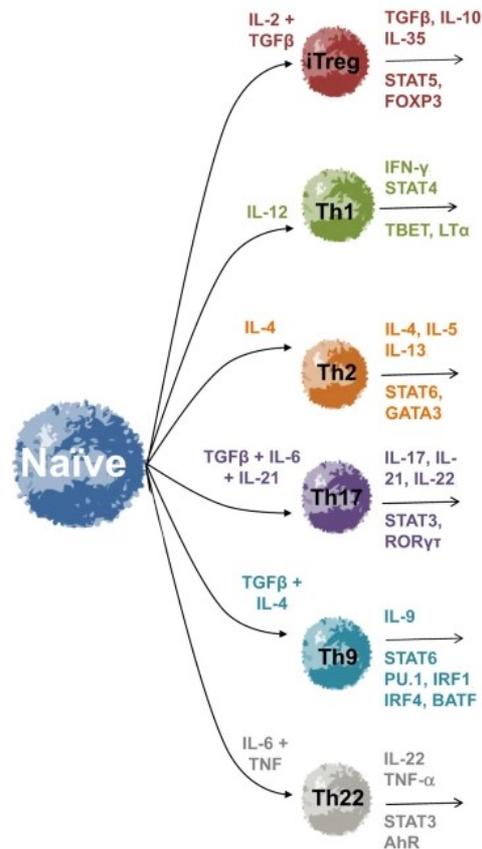


Figure 13 : Profils de différenciation des cellules lymphocytaires T CD4+ naïves sous l'influence de combinaisons cytokiniques. TGFβ : transforming growth factor ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; GATA-3 : Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3 ; RORγt : RAR-related orphan receptor gamma 2

Si les lymphocytes T_{EM} Th17 jouent un rôle central dans l'immunité anti-infectieuse pulmonaire en majorant le recrutement de neutrophiles (127), les T_{RM} viennent peupler le poumon. A partir d'un modèle de pneumonie lobaire à *Streptococcus pneumoniae*, les T_{RM} viennent préférentiellement se localiser dans le lobe atteint en comparaison du lobe controlatéral, l'immunité anti-infectieuse compartimentalisée étant plus efficace envers une agression à *S. pneumoniae* (128).

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont une sous-population de lymphocytes T CD4+ dotée de propriétés d'inhibition de la prolifération des autres lymphocytes T effecteurs. Ils jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie par

l'exercice d'une tolérance périphérique. Ces cellules exercent leur effet par le biais de 3 principaux mécanismes : la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β), une cytotoxicité par le biais de la voie perforine/granzyme et une inhibition de la maturation des cellules dendritiques (129). A l'état homéostatique, la présence de Tregs participe à déterminer l'orientation des lymphocytes T en fonction de l'âge. Dans les poumons humain des enfants âgés de moins de 2 ans, la proportion de Tregs est beaucoup plus importante en comparaison des adultes qui contiennent essentiellement des T_{RM} , avec un rapport Tregs/TRM contrôlant le degré de différenciation lymphocytaire T (130). En conditions inflammatoires, et en particulier dans les suites d'une pneumonie bactérienne, il existe une accumulation de Tregs au sein des poumons. Ces cellules sont en mesure d'infléchir la production de cytokines et de favoriser la réparation tissulaire (131,132).

Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sont impliqués dans la défense contre les pathogènes intracellulaires (virus et bactéries) ainsi que dans la réponse immunitaire anti-tumorale par différents mécanismes tels que la sécrétion de cytokines (TNF- α , IFN- γ), la production de perforine et de granzyme et l'activation du système pro-apoptique Fas / Fas-Ligand. L'activation, la prolifération et la différenciation des précurseurs T CD8+ nécessitent la présentation de l'antigène par les molécules du CMH de classe I, la présence de molécules de co-stimulation et un environnement cytokinique favorable. Au-delà des populations classiques de lymphocytes T, il existe des lymphocytes T dits non-conventionnels : les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les lymphocytes NKT. Les lymphocytes $T\gamma\delta$ possèdent un TCR $\gamma\delta$ mais n'expriment pas les co-récepteurs CD4 ou CD8. Chez l'Homme, les lymphocytes $T\gamma\delta$ possèdent une capacité de cytotoxicité, principalement exercée par le relargage de perforine et de granzyme. Les lymphocytes NKT expriment un TCR $\alpha\beta$ conventionnel semi-invariant et le CD3 mais sans CD4 ni CD8. Ils ne reconnaissent pas de complexes CMH-peptides mais des lipides et des glycolipides qui sont présentés par le CD1 et peuvent sécréter du TNF α , de l'IL-2 et de l'IL-4.

Ainsi, la survenue d'une pneumonie modifie profondément l'environnement immunitaire pulmonaire. Toutefois, il a été mis en évidence une grande hétérogénéité dans les profils de réponse immunitaire pulmonaire anti-infectieuse, en particulier dans le choc septique.

IV. Hétérogénéité des réponses immunitaires anti-infectieuses : compartmentalisation, tolérance et mémoire immunitaire innée

Parfois, une infection pulmonaire peut se manifester par une défaillance circulatoire sous la forme d'un choc septique. Comme précédemment décrit, il existe des données qui suggèrent qu'il coexiste à la phase initiale de ce syndrome une réaction pro-inflammatoire mais aussi anti-inflammatoire. Celles-ci se basent sur l'analyse du transcriptome des monocytes circulants mais aussi sur le dosage simultané de cytokines pro- et anti-inflammatoires (51–53). L'extrapolation des caractéristiques des cellules circulantes aux cellules résidentes d'organes est difficile, de même que l'évaluation de l'ambiance cytokinique intra-tissulaire.

A. Le concept de compartmentalisation

Une des façons simple d'évaluer l'orientation et l'intensité de la réponse inflammatoire est le dosage des cytokines et d'apprécier à la fois leur niveau de synthèse ainsi que la balance inflammatoire nette. Toutefois, cette approche est très restrictive et ne permet pas d'apprécier la complexité des réponses inflammatoires infectieuses au niveau tissulaire. Un exemple récent est celui de la pneumonie à SARS-CoV-2 dans laquelle les taux de cytokines circulants, dont l'IL-6 ou le $TNF\alpha$, sont somme toute assez modestes par rapport au site infectieux pulmonaire (133), et sont peu associés à la sévérité des patients, et au pronostic vital (134). Par comparaison, les taux de cytokines dans la COVID-19 sévère sont bien moindres qu'au cours du choc septique ou des syndromes de relargage cytokinique observés après réinjection de CAR-T cells, dans des rapports respectifs de 1 :10 et 1 :100. A gravité égale et après correction par de potentiels facteurs confondants, les niveaux de cytokine circulants ne sont pas comparables entre les patients ayant une infection à SARS-CoV-2 ou une grippe (135). Ces observations suggèrent qu'il existe une grande variabilité de l'orientation et de l'intensité des réponses inflammatoires au sein d'un même hôte en fonction du site de l'agression initiale et des pathogènes responsables.

En effet, la production de cytokines peut varier en intensité et en durée d'un organe à un autre pour une même agression à un temps donné. Par exemple, la réalisation d'une péritonite polymicrobienne par ligature et ponction caecale chez la souris (*LPC, ligature et ponction caecale*) entraîne une production transitoire de TNF α dans le p \acute{e} ritoine 16 fois plus importante que dans le sang puis se normalise après 24 heures alors que l'on détecte du TNF α pendant 5 jours dans le poumon (136). Chez des patients pris en charge pour une pneumonie, la concentration de TNF α retrouvée dans le LBA varie entre 0,5 et 247 fois celle mesurée dans le sang (4). Dans un modèle de LPC chez le rat, on retrouve différents niveaux d'expressions de gènes codant pour des protéines jouant un rôle important dans la réponse inflammatoire (IL-1 β , ROS, protéines du complément par exemple) au sein des différents organes (137). On retrouve aussi une grande variabilité de réponses cellulaires en fonction des différents organes. Ainsi, au décours d'une LPC, on observe une variation quantitative et fonctionnelle des macrophages tissulaires, l'amplitude et l'orientation de ces modifications variant en fonction des tissus explorés (5). Cette variabilité est retrouvée jusqu'au sein même des organes, avec une régionalisation de la réponse immune. Ainsi, chez des patients une pneumonie lobaire unilatérale, la concentration en IL-6 est beaucoup plus importante dans le lobe pulmonaire atteint en comparaison du lobe indemne (4).

A l'intérieur des organes, il existe une variabilité de la réponse anti-infectieuse au sein d'une même population. Dès 1967, McIntyre et coll. ont mis en évidence différents types de réponses macrophagiques, phagocytaire et bactériolytique, phagocytaire non bactériolytique ou non-phagocytaire, envers une infection par la bactérie *Salmonella enterica*, (138). Ces profils fonctionnels macrophagiques ont été identifiés comme responsables des différences de mortalité observées dans ce modèle (139). Le principal déterminant de cette variabilité de réponse entre la cellule et le pathogène est lié à des différences de réponse transcriptomique au LPS (6). Cette réponse transcriptomique a été montrée comme bimodale avec une variabilité d'épissage des ARN messagers à partir de cellules de moelle osseuse de souris stimulées par du LPS (140). Cependant, le ou les déterminants de cette variabilité restent imparfaitement compris.

Ainsi, il existe des données expérimentales et humaines robustes suggérant l'existence d'une hétérogénéité de la réponse inflammatoire au cours d'une

agression infectieuse à l'échelle de l'hôte, de l'organe, des tissus mais aussi des cellules. La réponse immunitaire anti-infectieuse n'est donc pas homogène mais compartimentalisée et variable dans le temps et dans son intensité. De plus, les modifications cellulaires induites en réponse à cette première agression infectieuse varient elles-aussi en fonction du type cellulaire et de l'organe considéré, ajoutant ainsi un niveau de complexité supplémentaire en cas de surinfection.

B. Hétérogénéité des réponses immunitaires après une première infection : tolérance et mémoire immunitaire innée

a. Le phénomène de tolérance

Les patients admis en réanimation pour un choc septique exhibent plusieurs anomalies quantitatives et fonctionnelles de l'immunité anti-infectieuse, dont la tolérance à l'endotoxine caractérisée par la diminution de la capacité des leucocytes circulants à sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL-6 au cours d'une stimulation *ex vivo* par le LPS (141). Toutefois, l'évaluation de la capacité des cellules circulantes à répondre à ce stimulus ne reflète pas le comportement de leurs homologues tissulaires au sein des organes. Par exemple, dans un modèle murin évaluant *ex vivo* la production de TNF α induite par LPS par des macrophages tissulaires après injection *in vivo* de LPS montre une absence de tolérance à l'endotoxine des macrophages alvéolaires en comparaison des macrophages péritonéaux ou circulants (142). Ce phénomène fournit un élément explicatif sur l'absence de relation entre le phénomène de tolérance à l'endotoxine et le risque d'infections nosocomiales chez les patients en choc septique (143). De plus, si la capacité de synthèse en cytokines des monocytes circulants est altérée après stimulations itératives au LPS, il a été montré que certaines fonctions anti-infectieuses telles que la phagocytose sont quant à elles augmentées (144). Ainsi, il semble s'agir d'une reprogrammation cellulaire plus que d'une paralysie fonctionnelle extensive. Ce phénomène s'apparente à celui de mémoire immunitaire innée, champ d'investigations importantes au cours des dix dernières années.

b. Le concept de mémoire immunitaire innée

Dans sa conception classique, la réponse immunitaire innée anti-infectieuse initiale précoce mais relativement peu spécifique est associée au déclenchement parallèle de la réponse immunitaire adaptative, plus lente, mais plus spécifique par le biais de réarrangements des récepteurs antigéniques. Il s'agit là du concept de « mémoire immunologique », utilisé par exemple dans le cadre de la vaccination préventive, et permettant une protection en cas de réinfection. Cette vision dichotomique entre une immunité innée précoce aspécifique et une mémoire immunitaire lente mais spécifique a été récemment remise en questions par plusieurs découvertes. En effet, il existe aussi une protection en cas de réinfections chez les plantes et les invertébrés qui ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif. De plus, plusieurs études rapportent une protection croisée en cas d'infections à des pathogènes différents chez l'homme (145). L'ensemble de ces observations a entraîné l'émergence du concept de mémoire immunitaire innée, ou *trained immunity*. Ce phénomène concerne plusieurs types cellulaires englobant les cellules myéloïdes et les CLI, qui partagent un mécanisme commun reposant sur des modifications épigénétiques post-infectieuses persistantes au cours du temps.

Ces modifications ne sont pas univoques. Par exemple, une infection virale par adenovirus entraîne l'induction de macrophages alvéolaires ayant un profil de *trained immunity*, associant une augmentation de l'expression du CMH-II et un profil transcriptomique pro-inflammatoire durant plusieurs semaines dans un modèle murin (94). En revanche, une pneumonie à *E. coli*, *S. aureus* ou virus Influenza A induit un profil de macrophage alvéolaires tolérogéniques, caractérisés par une diminution de capacité phagocytaire sous l'influence de modifications épigénétiques (146).

Ainsi, ces observations mettent en avant deux points particulièrement importants dans l'interprétation de la physiopathologie du choc septique : 1/ la réponse à un stimulus infectieux varie dans le temps et en intensité avec une compartimentalisation à l'échelle de l'organe, du tissu et du type cellulaire et 2/ la co-existence de phénomènes d'activation immunitaire et de tolérance au sein d'un organisme. Ces éléments peuvent justifier de reconsidérer le paradigme physiopathologique actuel du choc septique, qui a certainement le mérite de la

pédagogie, mais qui finalement reflète mal l'hétérogénéité extrinsèque et intrinsèque des réponses immunes chez l'hôte septique.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Alors que le phénotype immunologique et l'impact clinique des réponses immunosuppressives induites par le sepsis commencent à être pleinement appréciés, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent le développement et la profondeur de ces dysfonctions immunitaires acquises, la compartimentalisation des réponses immunes ainsi que la modulation par l'agression initiale demeurent néanmoins largement méconnus.

L'objectif principal de ce travail a été d'évaluer l'hétérogénéité extrinsèque et intrinsèque des réponses immunes post-septiques et les mécanismes physiopathologiques qui gouvernent ces phénomènes. Nous avons développé un projet de recherche translationnelle autour de trois grands axes de travail :

1/ évaluer la variabilité clinique dans la susceptibilité aux pneumonies nosocomiales chez des patients pris en charge en réanimation pour un sepsis ou un choc septique

2/ caractériser les réponses immunes pulmonaires envers un sepsis pulmonaire ou extra-pulmonaire chez l'animal

3/ évaluer le comportement fonctionnel individuel de monocytes circulants de patients en choc septique

Dans un premier temps, nous avons évalué le risque de survenue de pneumonie acquise sous ventilation mécanique dans une large population de choc septique admis en réanimation à l'hôpital Cochin (Paris) sur une période de 9 ans. Dans le contexte pandémique lié à la COVID-19, nous avons réalisé une étude multicentrique évaluant l'incidence et les déterminants des pneumonies acquises sous ventilation mécanique chez des patients pris en charge pour des pneumonies graves bactériennes ou virales à SARS-CoV-2 ou à virus Influenza.

Dans un second temps, nous avons investigué la variabilité des réponses immunes pulmonaires chez l'hôte septique en fonction du site d'infection primaire grâce à des modèles animaux pertinents de doubles agressions infectieuses séquentielles mimant la situation clinique commune de pneumonie nosocomiale.

Enfin nous avons exploré l'hétérogénéité des fonctions monocytaires en explorant la variabilité intercellulaire et chronologique de la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ après stimulation par LPS de monocytes circulants de patients septiques en comparaison de monocytes provenant de donneurs sains. Cette évaluation a été possible grâce à une technique innovante de microfluidique qui permet une évaluation fonctionnelle dynamique de la production de $\text{TNF}\alpha$.

RESULTATS

I. Article 1 : Pulmonary infections prime the development of subsequent ICU-acquired pneumonia in septic shock

Jean-François Llitjos, Aïcha Gassama, Julien Charpentier, Jérôme Lambert, Charles de Roquetaillade, Alain Cariou, Jean-Daniel Chiche, Jean-Paul Mira, Matthieu Jamme, Frédéric Pène

Annals of Intensive Care, 2019 Mar 15;9(1):39

Le choc septique représente la forme la plus grave de sepsis, avec une mortalité globale de l'ordre de 40%. Grâce à une reconnaissance plus précoce de cette entité et à l'amélioration de la prise en charge par les traitements anti-infectieux et les supports d'organes, les patients survivent de plus en plus à la phase initiale du choc septique. Ils sont alors exposés à un risque marqué d'infections nosocomiales, au premier rang desquelles les pneumonies acquises sous ventilation mécanique.

En évaluant les déterminants et les facteurs de risque de pneumonie acquise sous ventilation mécanique au cours du choc septique, nous avons constaté que ce risque était particulièrement marqué chez les patients pris en charge pour une pneumonie primaire. Ces données suggèrent qu'une première infection pulmonaire altère particulièrement les défenses locales envers une seconde infection. Cette observation a fondé le rationnel d'une modélisation expérimentale chez l'animal visant à évaluer les réponses immunes pulmonaires au décours d'une première agression infectieuse pulmonaire ou extra-pulmonaire.

RESEARCH

Open Access

Pulmonary infections prime the development of subsequent ICU-acquired pneumonia in septic shock



Jean-François Llitjos^{1,2,3}, Aïcha Gassama¹, Julien Charpentier¹, Jérôme Lambert^{4,5}, Charles de Roquetaillade¹, Alain Cariou^{1,2}, Jean-Daniel Chiche^{1,2,3}, Jean-Paul Mira^{1,2,3}, Matthieu Jamme^{6,7} and Frédéric Pène^{1,2,3*}

Abstract

Purpose: To investigate the determinants and the prognosis of intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia in patients with septic shock.

Methods: This single-center retrospective study was conducted in a medical ICU in a tertiary care center from January 2008 to December 2016. All consecutive patients diagnosed for septic shock within the first 48 h of ICU admission were included. Patients were classified in three groups: no ICU-acquired infections (no ICU-AI), ICU-acquired pneumonia and non-pulmonary ICU-AI. The determinants of ICU-acquired pneumonia and death were investigated by multivariate competitive risk analysis.

Results: A total of 1021 patients were admitted for septic shock, and 797 patients were alive in the ICU after 48 h of management. The incidence of a first episode of ICU-AI was 31%, distributed into pulmonary (17%) and non-pulmonary ICU-AI (14%). Patients with septic shock caused by pneumonia were at increased risk of further pulmonary ICU-AI with a cumulated incidence of 34.4%. A pulmonary source of the initial septic shock was an independent risk factor for subsequent ICU-acquired pneumonia (cause-specific hazard 2.33, 95% confidence interval [1.55–3.52], $p < 0.001$). ICU-AI were not associated with a higher risk of ICU mortality after adjustment in a multivariate-adjusted cause-specific proportional hazard model.

Conclusion: Septic shock of pulmonary origin may represent a risk factor for subsequent ICU-acquired pneumonia without affecting mortality.

Keywords: Septic shock, Immunosuppression, Nosocomial infection, Ventilator-acquired pneumonia

Introduction

Sepsis is an infection-related life-threatening condition characterized by an initial overwhelming pro-inflammatory response followed by a complex immunosuppressive response [1]. Septic shock, its most severe presentation, remains associated with a crude 40% mortality rate, as well as with numerous short-term and long-term complications. Thanks to early recognition of the disorder as

well as prompt institution of antimicrobial treatment and advanced life support, most septic shock patients nowadays survive the early phase of resuscitation but then become highly susceptible to intensive care unit (ICU)-acquired infections (ICU-AI) which account for a major cause of death in this setting [2, 3]. Prevention and management of complications in patients recovering from the primary insult now appear as cornerstone therapeutic challenges to improve the overall prognosis of septic shock.

ICU-acquired pneumonia accounts for the majority of ICU-AI in critically ill patients and is associated with increased mortality and other relevant poor outcomes such as prolonged ventilation and prolonged length of

*Correspondence: frederic.pene@aphp.fr

¹ Service de médecine intensive-réanimation, Hôpital Cochin, Hôpitaux Universitaires Paris-Centre, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, 27 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

stay in the ICU and in the hospital. Classical risk factors for ICU-acquired pneumonia rely on patients' characteristics including underlying immune and non-immune comorbid conditions, clinical severity and requirements for invasive ventilatory support [4]. Hence, endotracheal intubation and duration of mechanical ventilation are major determinants of so-called ventilator-associated pneumonia. Furthermore, a new paradigm of post-aggressive immunosuppression has emerged in critically ill patients [5]. Accordingly, sepsis-induced immune dysfunctions of most circulating immune cells have been associated with increased susceptibility to secondary infections in previously immunocompetent patients. Such explorations have been conducted in circulating blood cells for obvious accessibility reasons. The impact of multiple sequential insults within target organs on the subsequent risk of infectious complications remains unclear.

We hypothesize that a primary pulmonary infection may contribute to alterations in lung defense and thereby may favor the development of ICU-acquired pneumonia. The aim of this study is to investigate the determinants and the prognosis of ICU-acquired pneumonia in patients with septic shock, with a particular emphasis on linking primary and secondary infectious insults.

Patients and methods

Patients and setting

We performed a retrospective single-center study in a 24-bed medical ICU. All patients aged ≥ 18 years old diagnosed with septic shock within the first 48 h of ICU admission were included. Septic shock was defined as a microbiologically proven or clinically suspected infection, associated with acute circulatory failure requiring vasopressors despite adequate fluid filling. Patients who remained in the ICU after 48 h, and therefore at risk of ICU-acquired infections, formed the core of this study. Patients were classified in three groups: no ICU-acquired infections (no ICU-AI), ICU-acquired pneumonia and non-pulmonary ICU-AI. The ethics committee of the French Intensive Care Society approved the study and waived the need for patients' consents due to its retrospective observational design (ref. CE SRLF, #16–30).

Intended management

Patients were treated in accordance with the guidelines of the Surviving Sepsis Campaign [6]. Patients were administered intravenous broad-spectrum antibiotics, depending on the presumed site of infection, previous antibiotic treatment and known colonization with antibiotic-resistant bacteria. Antimicrobial treatment was deescalated to narrower spectrum after identification of the responsible pathogen. Source control measures, such as surgery

or removal of infected devices, were applied when necessary. They were subjected to a strict sedation protocol based on the Richmond Agitation-Sedation Scale assessment every 3 h and daily stop of sedatives whenever possible, as well as assessment of weaning criteria twice a day in order to reduce the length under mechanical ventilation. End-of-life decisions to withhold or withdraw life support were taken on collectively when maintenance or increase in life-sustaining therapies was considered as futile by all participants and that death would irremediably occur in a short-term manner. Palliative care was then appropriately delivered in the ICU.

Definitions

Severity at admission was assessed by the Simplified Acute Physiology Score 2 and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scores [7, 8]. Patients were considered immunocompromised if one or more of the following conditions were observed: patients with solid tumors with chemotherapy in the last 3 months or a progressive metastatic disease, hematologic malignancies, solid organ transplantation, HIV infection with or without AIDS, treatment with corticosteroids (>3 months at any dosage or ≥ 1 mg/kg prednisone equivalent per day for >7 day), or treatment with other immunosuppressive drugs.

The characteristics of both primary and secondary infections included the source and the causative microorganism if microbiologically documented. ICU-acquired infections were defined as any new onset of probable or definite infection that developed after 48 h from ICU admission [2]. Only the first episode of ICU-acquired infection was considered. ICU-acquired pneumonia was diagnosed according to the American Thoracic Society criteria [9]. Briefly, the diagnosis of pneumonia was based on a Clinical Pulmonary Infectious Score >6 . Patients with clinically suspected ventilator-associated pneumonia were usually subjected to a tracheobronchial aspirate with semiquantitative cultures. The diagnosis of ventilator-associated pneumonia and the decision to initiate or not antimicrobial treatment were discussed on daily rounds. A definite diagnosis of catheter-related bloodstream infection required the growth of the same pathogen from both peripheral blood and catheter tip cultures, or from blood cultures sampled from the catheter and from venous puncture with a differential time to positivity >120 min. The diagnosis of coagulase-negative *Staphylococcus* bloodstream infections required at least two positive blood cultures with the same pathogen. Urinary tract infections, mostly catheter related, were diagnosed upon the association of systemic manifestations of infection and positive urine bacterial culture at $\geq 10^5$ CFU/mL. Invasive fungal infections were diagnosed according

to the current guidelines [10]. The diagnostic work-up for ICU-AI did not change during the study period.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as median (interquartile range) and categorical variables as numbers (percentages) and were compared by the Kruskal–Wallis' test, the Pearson's Chi-square test or the Fisher's exact test as appropriate. ICU mortality was analyzed through a competitive risk framework, with discharge alive as a competing event. The independent predictors of ICU death were investigated in a multivariate Cox cause-specific model, by performing a stepwise backward and forward variable selections based on Akaike information criteria. The model included variables that were significant at p value of less than 0.20 in univariate analysis. Proportional hazard assumption was graphically checked, and potential interactions were tested in the final model. Because ICU-AI is a time-dependent covariate, we performed a Cox cause-specific survival analysis, with ICU-AI and the source of infection as predictors, at each landmark time. Landmarking is a common method recommended for the analysis of time-dependent covariates in time-to-event data. We chose each day from day 3 to day 30 for landmark times. Because multiple statistical tests increase the risk of type I error, we applied the Bonferroni correction to adjust p values (p value threshold = 0.003).

Determinants of ICU-acquired infections were also analyzed through a competing risk framework, with discharge alive and death in ICU as competing events. Since ICU-acquired infections are defined by the occurrence after 48 h, a landmark analysis was performed on the subset of patients still alive in ICU at day 3. Independent determinants of ICU-acquired infections were investigated in a multivariate analysis using a Cox cause-specific proportional hazard model with time-dependent covariates. All analyses were carried out using R 3.1.1 (R foundation for Statistical Computing Vienna, Austria) with the packages "survival", "cmprsk", "survival", "rms" and "stepwise."

Results

Patients

From January 2008 to December 2016, 1021 patients were admitted for septic shock in our ICU. Among them, 147 (14.4%) died early within 48 h and 77 (7.5%) rapidly improved to be promptly discharged from the ICU, leaving 797 patients alive in the ICU after 48 h of management (Additional file 1: Figure S1). Among them, 337 (42%) patients presented with community-acquired infections and 460 (58%) patients had hospital-acquired infections, with a previous in-hospital length of stay of 5 (1–17) days. Most 48-h survivors had underlying

comorbid conditions, including 276 (35%) with prior immunosuppression (Table 1). The lung was the most common source of the primary infection in 50% of patients. Adequacy of initial antimicrobial treatment in microbiologically documented infections was 91%. A large majority of patients were mechanically ventilated ($n=691$, 87%) with a median length of ventilation of 6 (3–12) days; 213 of the 797 48-h survivors (26.7%) died in the ICU. The independent determinants of ICU mortality are displayed in Table 2 and include demographics (age and gender), underlying comorbid conditions (immunosuppression and cirrhosis) and the extent of organ failures (invasive mechanical ventilation and renal replacement therapy).

Characteristics and outcome of ICU-acquired infections

Among 48-h survivors, the incidence of a first episode of ICU-AI was 31% ($n=249$), distributed into pulmonary ($n=139$, 17%) and non-pulmonary ICU-AI ($n=110$, 14%). Characteristics of ICU-AI are displayed in Table 3. Microbiological documentations of primary and ICU-acquired pneumonia were all different in terms of strains and/or antibiotic susceptibility. Non-pulmonary ICU-AI episodes were mainly related to catheter-related infections (43%) and abdominal infections (31%). Time from admission to ICU-AI diagnosis was similar for both pulmonary and non-pulmonary ICU-AI, 7 (5–11) days and 8 (5–12) days, respectively. Patients with ICU-AI exhibited higher SAPS2 severity score at ICU admission resulting in higher requirements for stress-dose steroids, invasive mechanical ventilation and renal replacement therapy (Table 1). Of note, the underlying immune status did not impact on the susceptibility to ICU-AI. The occurrence of ICU-AI was associated with protracted invasive mechanical ventilation, especially if pulmonary ICU-AI, and a marked increase in ICU mortality (46% vs. 18% in patients without ICU-AI, $p<0.001$). However, neither pulmonary nor non-pulmonary ICU-AI remained significantly associated with a higher risk of ICU mortality in a multivariate-adjusted cause-specific proportional hazard model (Fig. 1).

Determinants of pulmonary ICU-AI

Most importantly, we observed a link between sources of primary and secondary infections. Thus, patients with septic shock caused by pneumonia carried a particular susceptibility to further pulmonary ICU-AI with a cumulated incidence of 34.4% (Fig. 2a). In contrast, a primary pneumonia did not favor the occurrence of non-pulmonary ICU-AI (Fig. 2b). Differences between patients with ICU-acquired pneumonia and other patients without ICU-AI or with non-pulmonary ICU-AI are displayed in Table 1.

Table 1 Characteristics of patients

Variables	No ICU-AI (n = 548)	Pulmonary ICU-AI (n = 139)	Non-pulmonary ICU-AI (n = 110)	p
Age (years)	67 (56–78)	68 (57–78)	69 (57–78)	0.95
Male gender	335 (61)	110 (79)	61 (55)	<0.001
Comorbid conditions				
Immunosuppression	191 (35)	44 (32)	41 (37)	0.65
Chronic heart failure	130 (24)	25 (18)	22 (20)	0.31
Diabetes mellitus	111 (20)	22 (16)	22 (20)	0.52
COPD	93 (17)	25 (18)	17 (16)	0.87
Chronic renal failure	82 (15)	16 (11)	15 (14)	0.62
Obesity	59 (11)	11 (8)	13 (12)	0.57
Cirrhosis	57 (10)	19 (14)	15 (14)	0.39
Characteristics on ICU admission				
SAPS2, points	64 (49–81)	71 (54–88)	78 (57–89)	<0.001
SOFA score, points	9 (6–12)	10 (6–13)	9 (6–13)	0.05
Source of infection				<0.001
Lung	257 (47)	104 (75)	42 (38)	
Digestive	84 (15)	17 (12)	27 (24)	
Urinary	78 (14)	3 (2)	11 (10)	
Skin and soft tissues	41 (7)	3 (2)	5 (4)	
Catheter	33 (6)	3 (2)	8 (7)	
Others	55 (10)	9 (6)	17 (15)	
Microbiological documentation	440 (80)	112 (80)	95 (86)	
Bacteremia	186 (34)	35 (25)	40 (36)	0.09
Microorganisms				
Gram-negative bacteria	278 (50)	57 (41)	57 (52)	0.08
Gram-positive bacteria	151 (28)	49 (35)	33 (30)	
Fungi	10 (2)	6 (4)	4 (4)	
Mycobacteria	1 (0.2)	0 (0)	1 (1)	
Biological findings				
WBC count (per mm ³)	13.4 (6.8–22.5)	11.9 (4.7–21.4)	13.6 (7.6–21.9)	0.40
Serum protein level (g/L)	59 (52–66)	62 (51–68)	55 (47–65)	0.01
Serum creatinine level (μmol/L)	136 (85–201)	121 (73–204)	138 (80–241)	0.36
Serum bilirubin level (μmol/L)	12 (8–24)	12.5 (8–25)	13 (8–30)	0.72
Prothrombin time (%)	60 (46–73)	64 (45–75)	59 (41–71)	0.47
ICU management				
Invasive mechanical ventilation	448 (82)	137 (99)	106 (96)	<0.001
Renal replacement therapy	197 (36)	83 (60)	76 (69)	<0.001
Surgical source control	136 (25)	18 (13)	28 (25)	0.01
Aminoglycosides	321 (59)	64 (46)	69 (63)	0.01
Stress-dose steroids	228 (42)	70 (53)	64 (59)	<0.001
Outcomes				
Duration of mechanical ventilation (days)	4.5 (2–8)	18 (10–29.5)	13 (8–21)	<0.001
End-of-life decision	66 (12)	33 (24)	29 (26)	<0.001
ICU mortality	99 (18)	64 (46)	50 (45)	<0.001

Variables are expressed as median (interquartile range) or number (percentage) as appropriate

ICU intensive care unit, ICU-AI intensive care unit-acquired infections, COPD chronic obstructive pulmonary disease, SAPS2 Simplified Acute Physiology Score 2, SOFA Sequential Organ Failure Assessment, WBC white blood cell

Table 2 Determinants associated with ICU mortality using multivariate Cox cause-specific model

	CSH ratio	95% CI	p
Age			
0–59 years	Ref.	Ref.	Ref.
60–74 years	1.48	1.02–2.14	0.04
> 75 years	2.20	1.54–3.16	<0.001
Male gender	0.75	0.56–0.99	0.05
Immunocompromised status	1.63	1.23–2.16	<0.001
Cirrhosis	1.55	1.05–2.26	0.02
Mechanical ventilation	3.14	0.99–9.94	0.05
Renal replacement therapy	1.91	1.39–2.65	<0.001

CSH ratio cause-specific hazard ratio; 95% CI 95% confidence interval

Using a cause-specific Cox regression multivariate model, we plotted the pulmonary source of the primary infection against other relevant determinants of ICU-acquired pneumonia including prior invasive mechanical ventilation treated as a time-dependent covariate (Table 4). A primary pulmonary infection was an independent risk factor for subsequent ICU-acquired pneumonia (pulmonary vs. non-pulmonary primary infections: CSH 2.33, 95% confidence interval [1.55–3.52], $p < 0.001$). Similar results were obtained in a sensitivity analysis performed in the 691 patients who had required invasive mechanical ventilation (pulmonary vs. non-pulmonary primary infections: CSH 2.03, 95% confidence interval [1.35–3.05], $p < 0.001$).

Discussion

We herein reported that ICU-acquired pneumonia account for the majority of secondary infections in patients who survived the early days of septic shock. After adjustment with potential confounders, including the exposition to invasive mechanical ventilation, a primary pulmonary infection was independently associated with the development of further ICU-acquired pneumonia. This suggests that a primary pulmonary insult may impair lung defense mechanisms toward secondary infections.

Recent cohorts of sepsis and septic shock patients have reported that ICU-acquired infections remain frequent and dreaded complications, with incidence ranging from 13.5 to 23% [2, 11]. Incidence of nosocomial infections is higher in critical care setting than in general hospital wards given the complex interactions between underlying diseases, the severity of acute illness and the multiplicity and the maintenance of invasive devices [12, 13]. We reported here a slightly higher incidence ICU-AI of 31%, with a majority of nosocomial pneumonia, probably linked to the underlying characteristics of our

cohort. Although ICU-AI are clearly associated with a higher risk of death in critically ill patients, whether they directly contribute to mortality or only account for a surrogate marker of frailty remains questionable. Moreover, the burden of antimicrobial resistance is increasing, due to extensive antimicrobial use and protracted hospital length of stay, and raises new therapeutic challenges. Hence, early identification of ICU-AI and infection control measures are of major concern in preventing ICU-AI and decreasing the spread of antimicrobial resistance.

Although the development of ICU-AI is commonly associated with an increased risk of death, multiple additional factors are likely to contribute to mortality in critically ill patients including underlying comorbid conditions, accumulation of organ failures, infectious and non-infectious complications. This may frequently result in therapeutic limitations that may prevent appropriate diagnostic work-up and treatment. Sophisticated statistical models taking into account such confounders allow addressing the specific attributable mortality of nosocomial infections, defined as the percentage of death that would not have occurred without infection. Thus, recent studies retrieved little impact of ICU-acquired infections, and more specifically of ventilator-associated pneumonia, on ICU mortality [2, 14, 15]. Using a multivariate cause-specific hazard model, we observed that both pulmonary ICU-AI and non-pulmonary ICU-AI were not significantly associated with a higher risk of ICU mortality.

The major result of this study lies in the link between primary and secondary sources of infection. Specifically, we found that the pulmonary source of the primary infection was a risk factor for further ICU-acquired pneumonia, independent from prior requirement and duration of invasive mechanical ventilation. This result suggests regional disparities induced by different sources of infection that rely on the compartmentalization of immune responses. Primary pulmonary or non-pulmonary insults may differentially impact on lung defense and modulate the further susceptibility to superimposed infectious insults. The regimen and duration of prior antibiotics may also impact on the type of pathogens involved in ventilator-associated pneumonia and their eventual susceptibility to antimicrobials [16]. We also found that male patients had an increased risk of developing pulmonary ICU-AI. We could hardly find a definite explanation, but it is likely that sexual hormones play a role in the regulation of the immune system and may therefore impact on the eventual susceptibility to and outcome of sepsis [17].

It is now well documented that both pulmonary and non-pulmonary sepsis may induce various quantitative and functional changes in most immune cells [18], which have been associated with an increased susceptibility to

Table 3 Characteristics of ICU-acquired infections

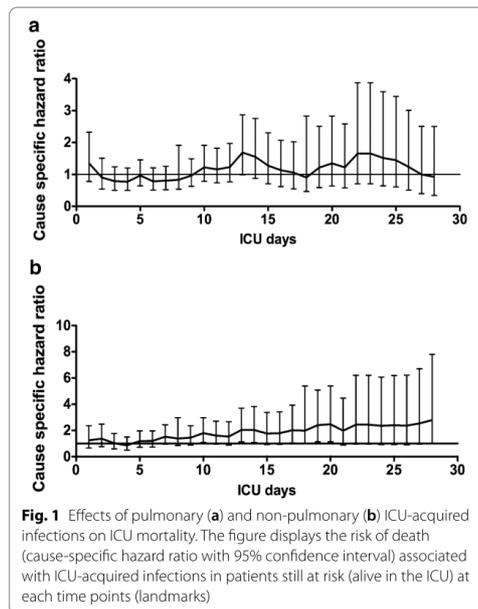
Variables	Pulmonary ICU-AI (n = 139)	Non-pulmonary ICU-AI (n = 110)	p
Time from admission to ICU-AI (days)	7 (5–11)	8 (5–12)	0.57
Sources of non-pulmonary ICU-AI			
Catheter	–	47 (43)	
Abdominal	–	34 (31)	
Skin and soft tissue	–	15 (14)	
Urinary	–	5 (4)	
Miscellaneous	–	3 (3)	
Unknown	–	6 (5)	
Microbiological documentation	112 (80)	85 (77)	0.10
Positive blood culture	11 (8)	61 (55)	< 0.001
Distribution of pathogens			< 0.001
Gram-negative bacteria			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39 (28)	10 (9)	
<i>Escherichia coli</i>	18 (13)	3 (2)	
<i>Enterobacter</i> spp.	15 (11)	13 (12)	
<i>Klebsiella</i> spp.	13 (9)	7 (6)	
<i>Serratia marcescens</i>	7 (5)	0 (0)	
Miscellaneous	7 (5)	1 (1)	
Gram-positive bacteria			
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 (4)	8 (7)	
<i>Enterococcus</i> spp.	1 (1)	11 (10)	
Miscellaneous	2 (2)	20 (19)	
Fungi			
<i>Candida albicans</i>	0 (0)	3 (2)	
Non- <i>albicans Candida</i>	0 (0)	6 (5)	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2 (1)	0 (0)	
Miscellaneous	2 (2)	0 (0)	
Virus			
<i>Cytomegalovirus</i>	0 (0)	3 (2)	
Further episodes of ICU-AI			0.08
None	85 (61)	72 (65)	
1 episode	25 (18)	26 (24)	
≥ 2 episodes	29 (21)	12 (11)	

Variables are expressed as median (interquartile range) or number (percentage), as appropriate

ICU intensive care unit, ICU-AI intensive care unit-acquired infections, MRSA methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, GNB gram-negative bacteria

secondary infections [19–22]. Furthermore, experimental studies have highlighted that different body compartments may not behave similarly following an infectious insult. For instance, alveolar macrophages do not produce interferon- β after LPS stimulation when compared to peritoneal macrophages [23]. Therefore, assuming a regional compartmentalization of immune response, several mechanisms could participate to explain the susceptibility of the lung to a second infectious hit after septic shock of pulmonary origin. A recent study reported acquired tolerogenic properties of pulmonary dendritic cells, an important subset of antigen-presenting cells,

following severe primary pulmonary infection with an increased susceptibility to secondary infections [24]. Besides sepsis-induced immunosuppression, various ICU interventions such as mechanical ventilation or systemic therapeutics such as antimicrobials, corticosteroids and transfusions may contribute to alter lung susceptibility to secondary infections. Since mechanical ventilation is a well-known risk factor for ventilator-associated pneumonia [9], pulmonary alterations due to mechanical ventilation may participate to lung susceptibility to secondary infections. In experimental models, ventilated injured lungs develop direct damage in both epithelial



and endothelial cells [25]. Another interesting line of approach is the relation between microbiota and antimicrobial treatment. A recent experimental study provides data suggesting that both intestinal and upper airway microbiota promote the innate response to pulmonary infections by enhancing pathogens clearance [26]. One

could hypothesize that a previous episode of pneumonia could modify the bacterial composition of respiratory microbiota and therefore promote susceptibility to secondary infections.

As already reported in a previous study involving part of the present cohort, we observed that the underlying immune status did not confer a higher susceptibility toward ICU-acquired infections [27]. Although this observation may contradict a common belief, several explanations can be proposed. All septic shock patients were exposed to invasive procedures and breakthrough of natural barriers to infections. Most non-immunocompromised patients exhibited non-immune comorbidities also likely to impair local and/or systemic anti-infectious defense mechanisms. Finally, sepsis-induced dysfunctions can promote profound immunosuppression smoothing away the immune capacities between immunocompromised and non-immunocompromised patients.

This study has several limitations. First, this was a retrospective study, performed in a single center with a particular case mix of patients and a high prevalence of immune comorbidities. Such a study can only identify association but not causality links between variables. Second, we were able to collect only ICU-acquired infections, but we did not address the incidence of further hospital-acquired infections following ICU discharge. Third, the study did not include a control group of patients with primary pneumonia but no septic shock, which may allow understanding the respective roles of pulmonary insults and shock on the further susceptibility to pulmonary ICU-AI. In addition, some potential confounders such as prior pulmonary lesions and prior

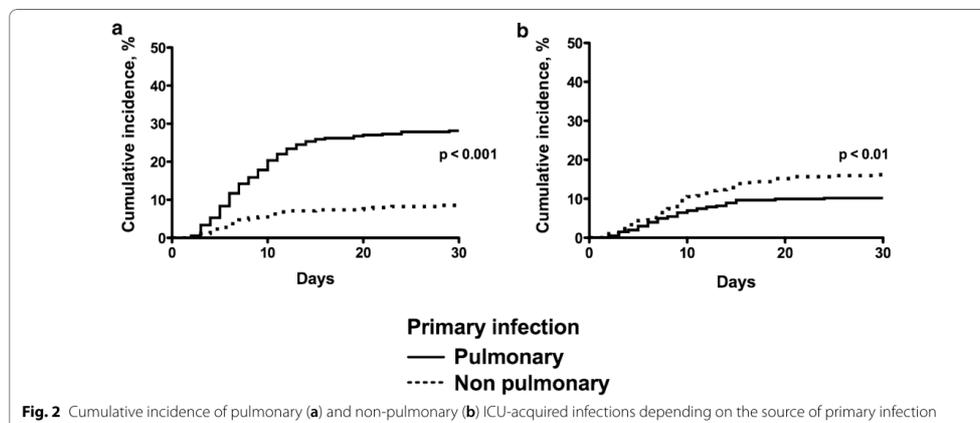


Table 4 Determinants associated with ICU-acquired pneumonia

Variables	Univariate			Multivariate		
	CSH ratio	95% CI	p	CSH ratio	95% CI	p
Male gender	2.14	1.41–3.25	< 0.001	2.17	1.35–3.45	0.001
Source of primary infection						
Lung	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Digestive	0.49	0.28–0.86	0.01	0.59	0.33–1.05	0.07
Urinary	0.24	0.07–0.76	0.01	0.29	0.09–0.89	0.03
Skin and soft tissue	0.29	0.09–0.93	0.03	0.33	0.10–1.04	0.06
Catheter	0.36	0.11–1.14	0.08	0.47	0.15–1.48	0.19
Others	0.43	0.20–0.88	0.02	0.49	0.23–1.02	0.05
Creatininemia	0.99	0.99–1	0.10			
SOFA score	1.03	1–1.06	0.04	1.03	1.01–1.07	0.03
Mechanical ventilation	1.16	0.47–2.84	0.75			
Aminoglycosides	0.67	0.47–0.94	0.02			

All covariates were analyzed at baseline status except for mechanical ventilation which was evaluated as time-dependent covariate
CSH ratio cause-specific hazard ratio, 95% CI 95% confidence interval, SOFA Sequential Organ Failure Assessment

antimicrobial exposure may also impact on the risk of pulmonary ICU-AI. Fourth, we focused on the first episode of ICU-acquired infection, whereas one third of those patients exhibited additional infection episodes throughout the ICU stay.

Conclusion

A prior episode of pulmonary infection in patients with septic shock may represent a major risk factor for secondary ICU-acquired pneumonia. A better understanding of pathophysiological mechanisms of post-septic alterations in lung defense could contribute to better stratify the risk of secondary pneumonia, and therefore identify patients likely to benefit from innovative preventive or therapeutic approaches.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Flowchart of the study. ICU: intensive care unit.

Abbreviations

HVEM: herpes virus entry mediator; ICU-AI: ICU-acquired infections; LPS: lipopolysaccharide; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment.

Authors' contributions

JFL and AG collected and analyzed data. JL, MJ and JFL performed data analysis and statistical analysis. JC, CR, AC and JPM analyzed data. JFL and FP analyzed data and wrote manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Service de médecine intensive-réanimation, Hôpital Cochin, Hôpitaux Universitaires Paris-Centre, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, 27 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. ² Université Paris Descartes, Paris, France. ³ INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris, France.

⁴ Service de bio-informatique médicale, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris, France. ⁵ Université Paris Diderot, Paris, France. ⁶ Urgences néphrologiques et transplantation rénale, Hôpital Tenon, Hôpitaux Universitaires Est-Parisien, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris, France. ⁷ Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Acknowledgements

None.

Presented at the congress "Réanimation 2018", 24–26 January 2018, Paris, France.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The ethics committee of the French Intensive Care Society approved the study and waived the need for patients' consents due to its retrospective observational design (ref. CE SRLF, #16–30).

Funding

None.

Publisher's Note

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

Received: 7 November 2018 Accepted: 7 March 2019

Published online: 15 March 2019

References

- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* 2013;13:260–8.

2. van Vught LA, Klouwenberg PMCK, Spitoni C, et al. Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA*. 2016;315:1469–79.
3. Daviaud F, Grimaldi D, Dechartres A, et al. Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care*. 2015;5:16.
4. Rello J, Ollendorf DA, Oster G, et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest*. 2002;122:2115–21.
5. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14:121–37.
6. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Crit Care Med*. 2017;45:486–552.
7. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, et al. 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.
8. Le Gall JR, 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.
9. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Executive summary: management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 2016;63:575–82.
10. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1813–21.
11. Landelle C, Lepape A, François A, et al. Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29:1054–65.
12. Suetens C, Latour K, Kärki T, et al. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Euro Surveill*. 2018;23:1800516.
13. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018.
14. Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RHH, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:665–71.
15. Bekaert M, Timsit J-F, Vansteelandt S, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a reappraisal using causal analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:1133–9.
16. Litjens J-F, Amara M, Benzarti A, et al. Prior antimicrobial therapy duration influences causative pathogens identification in ventilator-associated pneumonia. *J Crit Care*. 2018;43:375–7.
17. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:626–38.
18. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:862–74.
19. Grimaldi D, Louis S, Pène F, et al. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med*. 2011;37:1438–46.
20. Landelle C, Lepape A, Voirin N, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med*. 2010;36:1859–66.
21. Grimaldi D, Le Bourhis L, Sauneuf B, et al. Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med*. 2014;40:192–201.
22. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, et al. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock (Augusta, Ga)*. 2014;42:383–91.
23. Cavallion J-M, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*. 2006;12:151–70.
24. Roquilly A, McWilliam HEG, Jacqueline C, et al. Local modulation of antigen-presenting cell development after resolution of pneumonia induces long-term susceptibility to secondary infections. *Immunity*. 2017;47:135–147.e5.
25. Suki B, Hubmayr R. Epithelial and endothelial damage induced by mechanical ventilation modes. *Curr Opin Crit Care*. 2014;20:17–24.
26. Brown RL, Sequeira RP, Clarke TB. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat Commun*. 2017;8:1512.
27. Jamme M, Daviaud F, Charpentier J, et al. Time course of septic shock in immunocompromised and nonimmunocompromised patients. *Crit Care Med*. 2017;45:2031–9.

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

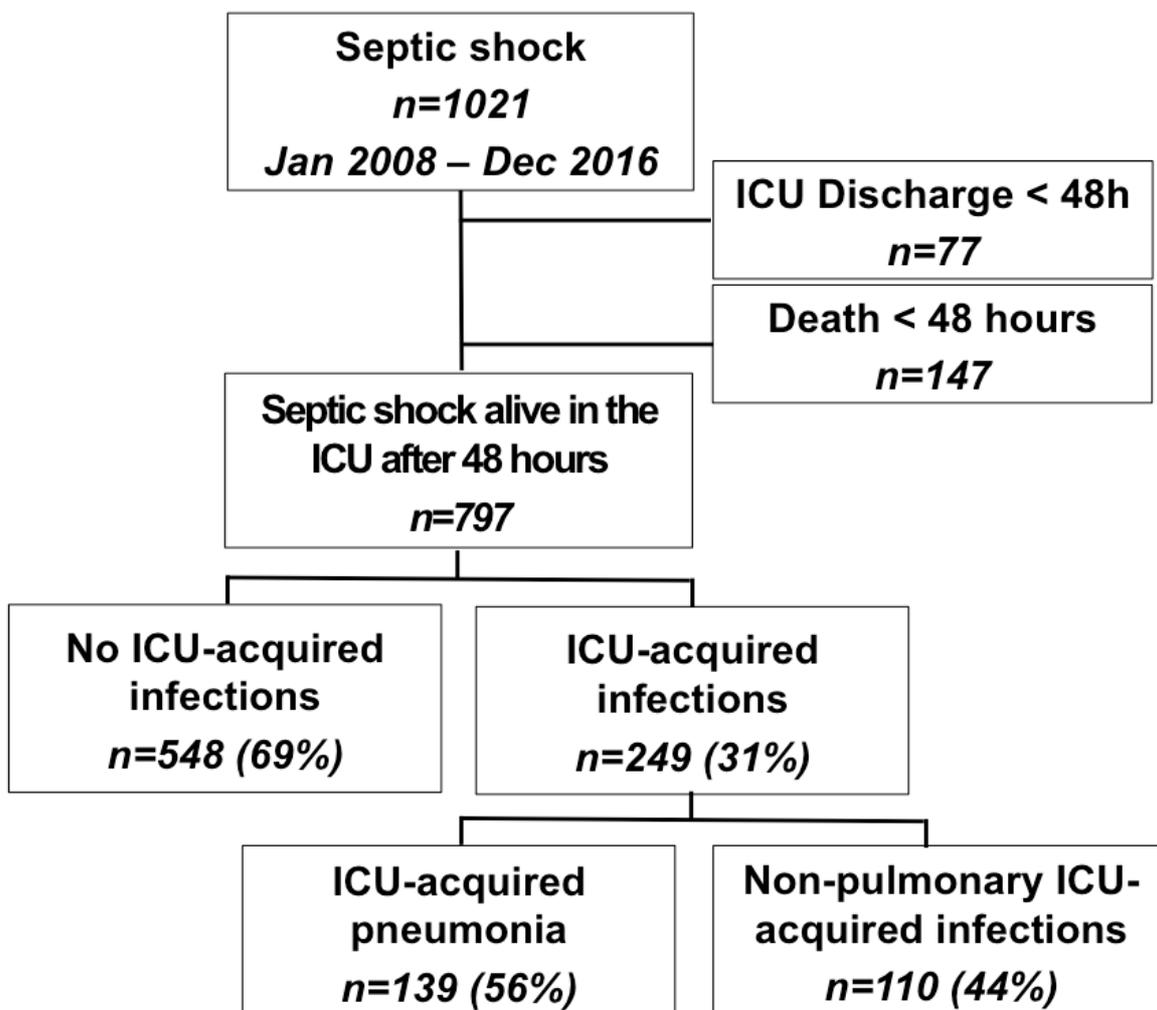


Figure S1: Flow-chart of the study. ICU: Intensive care unit.

II. Article 2: Increased susceptibility to intensive care unit-acquired pneumonia in severe COVID-19 patients: a multicentre retrospective cohort study

Jean-François Llitjos, Swann Bredin, Jean-Baptiste Lascarrou, Thibaud Soumagne, Mariana Cojocaru, Maxime Leclerc, Arnaud Lepetit, Albin Gouhier, Julien Charpentier, Gaël Piton, Matthieu Faron, Annabelle Stoclin, Frédéric Pène

Annals of Intensive Care, 2021 Jan 29;11(1):20

La pandémie de COVID-19 a entraîné un afflux massif de patients porteurs de pneumonies virales sévères à SARS-CoV-2 en réanimation. En raison des caractéristiques intrinsèques de cette pathologie induisant fréquemment un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) nécessitant souvent une ventilation mécanique prolongée, ces patients sont exposés à un risque accru de pneumonie nosocomiale.

Dans une étude multicentrique, nous avons évalué le risque de pneumonie acquise sous ventilation mécanique chez des patients pris en charge pour une pneumonie à SARS-CoV-2 en comparaison de deux cohortes historiques de patients ventilés en réanimation pour une grippe grave ou pour une pneumonie bactérienne. En utilisant un modèle de risque compétitif, nous avons identifié que la COVID-19 était indépendamment associée à un risque accru de pneumonie nosocomiale, suggérant ainsi que l'infection à SARS-CoV-2 induit des altérations particulières de l'immunité pulmonaire.

RESEARCH

Open Access



Increased susceptibility to intensive care unit-acquired pneumonia in severe COVID-19 patients: a multicentre retrospective cohort study

Jean-François Llitjos^{1,9*}, Swann Bredin², Jean-Baptiste Lascarrou³, Thibaud Soumagne⁴, Mariana Cojocaru⁵, Maxime Leclerc⁶, Arnaud Lepetit⁶, Albin Gouhier⁷, Julien Charpentier², Gaël Piton⁴, Matthieu Faron⁸, Annabelle Stoclin⁹ and Frédéric Pène^{1,2}

Abstract

Background: The aim of this study is to determine whether severe COVID-19 patients harbour a higher risk of ICU-acquired pneumonia.

Methods: This retrospective multicentre cohort study comprised all consecutive patients admitted to seven ICUs for severe COVID-19 pneumonia during the first COVID-19 surge in France. Inclusion criteria were laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection and requirement for invasive mechanical ventilation for 48 h or more. Control groups were two historical cohorts of mechanically ventilated patients admitted to the ICU for bacterial or non-SARS-CoV-2 viral pneumonia. The outcome of interest was the development of ICU-acquired pneumonia. The determinants of ICU-acquired pneumonia were investigated in a multivariate competing risk analysis.

Result: One hundred and seventy-six patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia admitted to the ICU between March 1st and 30th June of 2020 were included into the study. Historical control groups comprised 435 patients with bacterial pneumonia and 48 ones with viral pneumonia. ICU-acquired pneumonia occurred in 52% of COVID-19 patients, whereas in 26% and 23% of patients with bacterial or viral pneumonia, respectively ($p < 0.001$). Times from initiation of mechanical ventilation to ICU-acquired pneumonia were similar across the three groups. In multivariate analysis, the risk of ICU-acquired pneumonia remained independently associated with underlying COVID-19 (SHR = 2.18; 95 CI 1.2–3.98, $p = 0.011$).

Conclusion: COVID-19 appears an independent risk factor of ICU-acquired pneumonia in mechanically ventilated patients with pneumonia. Whether this is driven by immunomodulatory properties by the SARS-CoV-2 or this is related to particular processes of care remains to be investigated.

Keywords: COVID-19, Ventilator-acquired pneumonia, Immunosuppression, Septic shock

Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic caused by SARS-CoV-2 infection is responsible for severe pulmonary involvement frequently requiring intensive care unit (ICU) admission for advanced respiratory support [1]. It rapidly came out that this new pulmonary infection exhibited specific pathophysiological and

*Correspondence: jeanfrancois.litjos@gustaveroussy.fr

⁹ Intensive care unit, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France

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



© The Author(s) 2021. 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/>.

clinical features, making it somewhat different from more classical bacterial and viral pneumonia. In the absence of efficient therapy, mechanical ventilation is the cornerstone of the COVID-19 management but then exposes patients to ICU-acquired infections.

ICU-acquired pulmonary infections are major complications of invasive mechanical ventilation, responsible for respiratory deterioration, extra-pulmonary organ dysfunctions and prolongation of ventilation and of the length stay in the ICU. Hence, ICU-acquired pneumonia is a frequent complication in critically ill ventilated patients, with incidences ranging from 13.5 to 23%, and accounts for a major cause of morbidity and mortality in septic patients [2]. Prolonged mechanical ventilation represents the leading risk factor of ICU-acquired pneumonia. We also previously reported that septic shock patients with pneumonia exhibited the highest risk of ICU-acquired pneumonia, suggesting that a primary pulmonary insult may drive profound alterations in lung defence towards a secondary infectious insult [3]. As a matter of fact, sepsis-induced immunosuppression as assessed by quantitative and functional defects in circulating immune cells has been associated with increased susceptibility to secondary ICU-acquired infections (ICU-AI) [4]. Whether COVID-19 patients harbour different susceptibility towards secondary infections have not been investigated.

To address these questions, we investigated the incidence and the determinants of ICU-acquired pneumonia in mechanically ventilated COVID-19 patients, as compared to control patients with severe bacterial or viral pneumonia.

Methods

Study design and participants

We performed a retrospective study in seven ICUs within six French hospitals. The study gathered consecutive adult patients (aged ≥ 18 years old) admitted to the ICU with a PCR-confirmed SARS-CoV-2 pneumonia requiring mechanical ventilation. Only patients who received endotracheal intubation during the first two days following ICU admission and required mechanical ventilation for at least 48 h were included. COVID-19 patients were compared to mechanically ventilated patients with community-acquired bacterial or viral pneumonia, extracted from a retrospective 2008–2017 database of the medical ICU of Cochin hospital [3]. The Research Ethics Committee of the Institut Gustave Roussy approved the study and waived the need for patient's consent. The study was registered at the French National Commission on Informatics and Liberty and at the French National Institute for Health Data. The ethics committee of the French Intensive Care Society had previously approved

the constitution of the historical database (ref. CE SRLF, #16–30).

Data collection

Demographic, clinical, laboratory, treatment and organ support at baseline, and outcome data were collected from electronic medical records using a standardized data collection form. Given the protracted mechanical ventilation that were observed in COVID-19 patients at the beginning of the outbreak [5], the observation period was extended to day 45.

Definitions

Laboratory confirmation of COVID-19 was based upon SARS-CoV-2 detection by real-time RT-PCR from nasal swabs or lower respiratory tract secretions. Obesity was defined as a body mass index superior to 30 kg/m². Patients were considered immunocompromised if one or more of the following conditions were observed: patients with solid tumours with chemotherapy in the last 3 months or a progressive metastatic disease, hematologic malignancies, solid organ transplantation, HIV infection with or without AIDS, treatment with corticosteroids (>3 months at any dosage or ≥ 1 mg/kg prednisone equivalent per day for >7 day), or treatment with other immunosuppressive drugs. Severity at admission was assessed by the Simplified Acute Physiology Score 2 and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scores. Acute respiratory distress syndrome (ARDS) was diagnosed according to the Berlin definition [6].

ICU-acquired pneumonia was defined as new onset of probable or definite infection not present at the time of ICU admission and that developed after the first 48 h from ICU admission. Only the first episode of ICU-acquired pneumonia was considered for the present analysis. ICU-acquired pneumonia diagnosis was based on a Clinical Pulmonary Infectious Score >6 [7]. Patients with clinically suspected ICU-acquired pneumonia were subjected to a tracheobronchial aspirate or broncho-alveolar lavage with direct Gram staining and semi-quantitative culture [7]. Invasive fungal infections were diagnosed according to current guidelines [8]. An independent physician (JFL) retrospectively assessed the diagnostic accuracy of all episodes of ICU-acquired pneumonia.

Patient management

Management of sepsis and septic shock was in accordance with the guidelines of the Surviving Sepsis Campaign [9]. Antimicrobial treatments were administered intravenously depending on the clinical suspicion of infection and known colonization with antibiotic-resistant bacteria and deescalated to narrower spectrum after identification of the responsible pathogen. Management

of ARDS in the COVID-19 cohort followed the French Intensive Care Society guidelines [10]. Strategies to prevent ICU-acquired pneumonia were implemented according to guidelines and included the use of weaning protocols, semi-recumbent position, enteral route feeding and physiotherapy [7]. End-of-life decisions to withhold or withdraw life support were taken independently at each centre and palliative care was then appropriately delivered in the ICU.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as median (interquartile range) and categorical variables as numbers (percentages) and were compared by the Kruskal–Wallis test, the Pearson's Chi-square test or the Fisher's exact test as appropriate. The independent predictors of ICU death were investigated through a multivariate Fine–Gray model analysis to fit cumulative incidence curves. The model included variables that reached p value less than 0.20 in univariate analysis.

Determinants of ICU-acquired pneumonia were analysed through a competing risk framework, with death in ICU and extubation for more than 48 h as competing events. Independent determinants of ICU-acquired pneumonia were investigated in a multivariate analysis using a Fine–Gray model to fit cumulative incidence curves. We also investigated the determinants of ICU-acquired pneumonia using a cause-specific Cox model. The model included variables that reached p values of less than 0.20 in univariate analysis and proportional hazard assumption was checked using graphical diagnostics based on the scaled Schoenfeld residuals. All analyses were carried out using R 3.3.3 (R foundation for Statistical Computing Vienna, Austria).

Results

COVID-19 and non-COVID-19 cohorts

Between March 1st and 30th June of 2020, 176 patients were admitted in ICU for severe SARS-CoV-2 pneumonia requiring invasive mechanical ventilation for more than 48 h. Their main characteristics are summarized in Table 1. Arterial hypertension and obesity were the prominent comorbid conditions. Time from symptoms onset to ICU admission was 7.5 (4.25–10) days. About one-third of COVID-19 patients ($n=66$, 37%) received specific antiviral treatments, including hydroxychloroquine and azithromycin combination in 39 patients, lopinavir in 18 patients and remdesivir in 8 patients. Twelve COVID-19 patients (6%) were treated with steroids (dexamethasone) and one patient received tocilizumab. Bacterial co-infection was documented in 21 (12%) patients. Nearly all patients fulfilled the criteria for ARDS ($n=170$, 96%) and most of them underwent prone positioning

($n=130$, 74%) with a median number of 3 (1–7) sessions. Rescue veno-venous extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) was used in 10 patients. The overall ICU mortality rate was 31% ($n=55$) and the median duration of mechanical ventilation was 17 days (25th–75th IQR: 10–28). Half of patients (49%) with bacterial pneumonia received stress-dose hydrocortisone for acute circulatory failure.

Control groups were patients with severe bacterial ($n=435$) or viral ($n=48$) pneumonia. Their characteristics are displayed in Table 1, and compared with those of COVID-19 patients. All cases of viral pneumonia were related to influenza virus, except two episodes related to metapneumovirus and cytomegalovirus. Bacterial co-infection was documented in 11 (24%) patients with viral pneumonia. The overall ICU mortality was 33% in patients with bacterial pneumonia and 25% in viral pneumonia.

COVID-19 and non-COVID-19 patients markedly differ in a number of underlying characteristics and clinical presentation of acute condition (Table 1). Although COVID-19 patients exhibited lower admission severity scores, they more often fulfilled the diagnostic criteria for ARDS. COVID-19 finally exhibited increased duration under mechanical ventilation (median 17 days vs. 8 days in bacterial pneumonia and 7 days in viral pneumonia, $p<0.001$) and eventually increased length of stay in the ICU (median 20 days vs. 10 days in bacterial pneumonia and 9 days in viral pneumonia, $p<0.001$). In-ICU mortality rates of COVID-19 and bacterial pneumonia were similar (31% and 33%, respectively), both slightly higher than that of viral pneumonia (25%). However, the mortality rates did not differ across even after adjustment with other confounders (Additional file 1: Table S1).

ICU-acquired infections in COVID-19 and non-COVID-19 patients

The frequency of ICU-acquired pneumonia was 52% in COVID-19 patients, with a median time from intubation to diagnosis of 9 (6–14) days (Fig. 1). ICU-acquired pneumonia was responsible for deterioration to septic shock in half of cases. Patients with bacterial pneumonia and viral pneumonia exhibited lower ICU-acquired pneumonia frequencies of 26% and 23%, respectively (Table 2). Times from intubation to ICU-acquired pneumonia were 9 (6–12) days in bacterial pneumonia and 7 (6.5–14) days in viral pneumonia, thereby similar to that of COVID-19 patients. The distribution of causing pathogens is precised in Table 2. In multivariate analysis taking into account mechanical ventilation as a time-dependent variable, the independent determinants of ICU-acquired pneumonia were COVID-19 pneumonia (SHR=2.18; 95% CI 1.2–3.98, $p=0.011$), male gender (SHR=1.55;

Table 1 Characteristics and outcome of patients with COVID-19, bacterial pneumonia or viral pneumonia

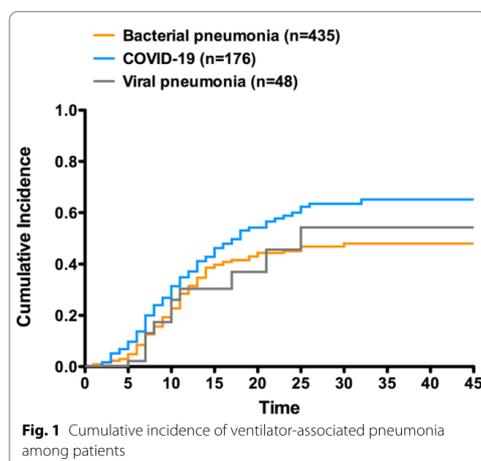
Variables	COVID-19 (n = 176)	Bacterial pneumonia (n = 435)	Viral pneumonia (n = 48)	p
Age, years	63 (55–73)	66 (56–79)	72 (42–75)	0.002
Male gender	134 (76)	296 (68)	25 (52)	< 0.001
Body mass index, kg/m ²	28.2 (26–32.3)	23.4 (20.7–26.7)	23 (19.2–28.9)	< 0.001
Comorbid conditions				
Immunosuppression	26 (15)	145 (33)	13 (27)	< 0.001
Cirrhosis	2 (1)	41 (9)	1 (2)	< 0.001
Diabetes mellitus	45 (26)	89 (21)	7 (14)	0.181
COPD	17 (10)	103 (24)	9 (19)	< 0.001
Chronic renal failure	13 (7)	49 (11)	7 (15)	0.22
Cancer (ongoing or < 5 years)	16 (9)	120 (28)	8 (17)	< 0.001
Severity on ICU admission				
SAPS2, points	43 (30–56)	73 (55–88)	47 (39–71)	< 0.001
SOFA, points	6 (4–9)	9 (6–2)	7 (2–13)	< 0.001
Biological findings				
WBC count, per mm ³	8.4 (6.9–12.4)	12 (6.2–17.6)	8.8 (3.4–11.7)	< 0.001
Lactate, mmol/L	1.5 (1.2–1.9)	1.7 (1–3.8)	1.4 (0.4–3.1)	0.02
Characteristics of pneumonia				
Clinical presentation				
Septic shock (Sepsis-3)	28 (16)	191 (44)	15 (31)	< 0.001
ARDS	170 (96)	62 (14)	17 (35)	< 0.001
Microbiological documentation	21 (12)	286 (66)	11 (24)	< 0.001
Gram-negative bacteria	11 (7)	148 (34)	5 (10)	
Gram-positive cocci	10 (6)	126 (30)	6 (13)	
SARS-CoV-2	176 (100)	0	0	
Influenza virus	0	0	46 (96)	
Miscellaneous	0	12 (3)*	2 (4)**	
ICU management within the first 48 h				
Antimicrobial agents	161 (92)	435 (100)	45 (94)	< 0.001
Vasopressors	371 (85)	147 (83)	37 (71)	0.32
Prone positioning	130 (74)	41 (9)	9 (19)	< 0.001
Number of sessions	3 (2–5)	2 (1.5–2.5)	1 (1–2)	< 0.001
Anaesthesia ventilator	12 (7)	0 (0)	0 (0)	< 0.001
Extracorporeal membrane oxygenation	10 (6)	14 (3)	5 (10)	0.04
Renal replacement therapy	51 (29)	44 (10)	9 (19)	< 0.001
Blood transfusions	67 (38)	223 (51)	18 (37)	0.01
Corticosteroids	12 (6)	213 (49)	0 (0)	< 0.001
Outcomes				
Total duration of mechanical ventilation, days	17 (10–28)	8 (5–16)	7 (4–13)	< 0.001
ICU length of stay, days	20 (12–30)	10 (6–19)	9 (6–16)	< 0.001
ICU mortality	55 (31)	143 (33)	12 (25)	< 0.001

ICU, intensive care unit, ICU-AI, intensive care unit-acquired infections, COPD, chronic obstructive pulmonary disease, SAPS2, Simplified Acute Physiology Score 2, SOFA, Sequential Organ Failure Assessment score, WBC, white blood cell. Variables are expressed as median (interquartile range) or number (percentage) as appropriate

* Including fungi (n = 10) and mycobacteria (n = 2), **Including metapneumovirus (n = 1) and cytomegalovirus (n = 1)

95% CI 1.14–2.12, $p = 0.005$), ARDS (SHR = 1.84; 95% CI 1.25–2.72, $p = 0.002$) and duration of mechanical ventilation (SHR = 1.027, 95% CI 1.01–1.04, $p \leq 0.001$) (Table 3). Of note, because control cohorts were obtained from

one centre, this variable was considered in our statistical analysis and was not associated with ICU-acquired pneumonia.



Discussion

COVID-19 pandemic has shed light on the risk of shortage in ICU beds related to the surge of ICU admissions, but also to prolonged bed occupancy by patients with sustained respiratory failure. Prolonged mechanical ventilation in SARS-CoV-2 pneumonia can be primarily ascribed to the severity of the lung injury, but also to the development of secondary complications. In this study, we addressed the specific risk of ICU-acquired pneumonia in the course of severe. When compared to recent cohorts of patients

with non-COVID-19 pneumonia, patients with severe SARS-CoV-2 pulmonary infection exhibited a prominent risk of ICU-acquired pneumonia.

Other studies have already reported various frequency rates of ICU-acquired pneumonia in mechanically ventilated COVID-19 patients, with estimated incidence ranging from 16 to 31% in two early reports from China [11, 12]. Since then, several studies confirmed this impression [13–16]. Importantly, an accurate estimation for the cumulative risk of ICU-acquired pneumonia in ventilated patient requires handling two main competing events that are extubation and death to avoid misinterpretation of risks. The high rate of ICU-acquired pneumonia in COVID-19 patients may result from a particular susceptibility to pulmonary superinfections. The question is whether COVID-19 stands as risk factor of ICU-acquired infections on its own, or if this association is rather related to confounding factors such as exposure to invasive devices or significant changes in care practice. Such a retrospective study can hardly provide a definite answer between causality and association, despite investigating the potential confounders and entering them into multivariate models. Since ICU-acquired pneumonia is strongly associated with the duration under invasive mechanical ventilation, we treated mechanical ventilation as a time-dependent covariate in multivariate analysis [17]. Nonetheless, it is noteworthy that times from intubation to the first episode of ICU-acquired pneumonia were similar across the three groups. Of note, nearly all patients from the three groups had received antibiotics in the early days in the ICU. The increased risk

Table 2 Intensive care unit-acquired pneumonia (ICU-AP) in patients

ICU-acquired pneumonia	COVID-19 (n = 92)	Bacterial pneumonia (n = 113)	Viral pneumonia (n = 11)	p
Frequency	92 (52)	113 (26)	11 (23)	< 0.001
Time from intubation to first ICU-AP, days	9 (6–14)	9 (6–12)	7 (6.5–14)	0.70
Deterioration to septic shock	45 (49)	72 (64)	5 (45)	0.01
Microbiological documentation				
Enterobacteriaceae	50	27	3	< 0.001
Non-fermenting GNB	20	114	7	
Gram-positive cocci	28	3	1	
Polymicrobial	24 (16)	19 (17)	2 (4)	
Fungi	1	2	0	
Subsequent episodes of ICU-AP				
Second	37 (21)	53 (12)	3 (6)	
Third	15 (8)	37 (8)	3 (6)	
Fourth	2 (1)	12 (3)	0	

ICU, intensive care unit, ICU-AP, intensive care unit-acquired pneumonia. Variables are expressed as median (interquartile range) or number (percentage) as appropriate

Table 3 Determinants associated with ICU-acquired pneumonia using sub-distribution hazard ratio in univariate and multivariate analysis

Variables group	Univariate			Multivariate		
	SHR	95% CI	<i>p</i>	SHR	95% CI	<i>p</i>
Group						
Bacterial pneumonia	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
COVID-19	1.52	1.17–1.98	0.001	2.18	1.2–3.98	0.011
Viral pneumonia	0.8	0.46–1.42	0.46	0.76	0.43–1.36	0.35
Male gender	1.67	1.23–2.27	0.001	1.55	1.14–2.12	0.005
Obesity	1.25	0.96–1.63	0.094			
Immunosuppression	0.68	0.5–0.93	0.02			
Admission SAPS2, per point	0.99	0.99–1	0.06			
Admission SOFA, per point	0.97	0.95–1.01	0.15			
COPD	0.65	0.45–0.97	0.032			
Cancer	0.73	0.52–1.04	0.081			
Prone positioning	1.03	1–1.07	0.075			
Vasopressors	1.42	0.97–2.08	0.073			
Blood transfusion	1.21	0.93–1.57	0.15			
Conventional respiratory device	0.39	0.21–0.73	0.003			
Antimicrobial treatment	0.46	0.24–0.9	0.023			
ARDS	1.61	1.39–2.37	<0.001	1.84	1.25–2.72	0.002
Duration of MV prior to VAP, days	1.02	1.02–1.04	<0.001	1.027	1.01–1.04	<0.001

SAPS2, Simplified Acute Physiology Score 2; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ARDS, acute respiratory distress syndrome; MV, mechanical ventilation. All covariates were analysed at baseline except for mechanical ventilation that was evaluated as time-dependent covariate

of ICU-acquired pneumonia may also be related to increased workload that may have prevented strict and thorough implementation of preventive bundles.

COVID-19 has emerged as a particular infection with a characteristic two-step course in a significant proportion of patients. Whereas the primary symptoms are associated with viral shedding, secondary respiratory deterioration is associated with potent systemic acute inflammatory response. The pathophysiology of COVID-19 lung involvement encompasses endothelial and epithelial alterations as well as pulmonary embolism and microvascular thrombosis. Besides, secondary infectious insults sustain acute lung injury and likely contribute to prolonged mechanical ventilation. The particular susceptibility of post-COVID critically ill patients to ICU-acquired pneumonia suggests defective anti-infective immune responses against bacterial superinfections reminiscent of those observed in post-septic patients [18]. Sepsis-induced immunosuppressive response is related to various quantitative and functional alterations in most immune cells [4]. Whether such immune dysfunctions may also account for increased susceptibility to secondary infections in COVID-19 patients remains to be investigated.

Interventional studies for severe COVID-19 have so far attempted dampening the primary pro-inflammatory

cytokine response by anti-inflammatory compounds, most especially to prevent the respiratory deterioration of patients with mild pneumonia. There is no signal so far that such early immunomodulatory therapeutics of COVID-19 may increase the risk of secondary infections. However, the particular susceptibility of COVID-19 patients to secondary bacterial infections raises the question of immunostimulant strategies later on in the ICU. For instance, drugs known to restore monocyte functions and HLA-DR and CD14 expressions such as interferon gamma (IFN γ) or GM-CSF, or drugs to restore lymphocyte activation such as IL-7 or thymosin- α may represent attractive therapeutic options in this setting [19].

This study has several limitations. Although improving the external validity, the multicentre design also harbours the risk of inconsistent care and diagnostic procedures. The diagnosis of ICU-acquired pneumonia was let at the discretion of the physician in charge, with the help of a validated score, and was reviewed by an independent investigator to ensure appropriate and consistent diagnosis. Data from severe COVID-19 patients were obtained from seven different ICUs, whereas controls with bacterial and viral pneumonia were obtained from one single centre. However, frequencies of secondary pneumonia in COVID-19 patients were consistent across centres, and the centre effect was taken into account in

the multivariate models. Most importantly, such a retrospective study is limited to establish a definite causality inference, although we aimed at taking into account major determinants of ICU-acquired pneumonia in the multivariate model.

Conclusion

We identified SARS-CoV-2 infection as an independent risk factor of ICU-acquired pneumonia among mechanically ventilated patients with common bacterial and viral causes of pneumonia. This justifies a thorough reinforcement of preventive measures in these high-risk patients. In the light of immunomodulatory approaches to treat COVID-19, our results raise the question of immunostimulant therapies to fight bacterial superinfections in critically ill COVID-19 patients.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13613-021-00812-w>.

Additional file 1: Table S1. Determinants of ICU mortality using sub-distribution hazard ratio (SHR) in univariate and multivariate analysis.

Acknowledgements

None.

Authors' contributions

JFL designed the study, performed statistical analysis and wrote manuscript. SB, JBL, TS, MC, ML, AL, AG, JC, GP and AS collected data and wrote manuscript. MF performed and supervised statistical analysis. FP designed the study and wrote manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The funder of the study (French Agence Nationale de la Recherche) had no role in study design, data collection, analysis or interpretation and concerned only the cytometric analysis of the study.

Availability of data and materials

Data and material are available under request.

Ethics approval and consent to participate

The Research Ethics Commission of the Institut Gustave Roussy approved the study. The study was registered at the French National Commission on Informatics and Liberty and at the French National Institute for Health Data. The ethics committee of the French Intensive Care Society had previously approved the constitution of the historical database and waived the need for patients' consents (ref. CE SRLF, #16–30).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

F Pène: Alexion Pharma (grant paid to his institution) and Gilead (consultancy and lecture fees).

Author details

¹ 3i Department, Team Pulmonary and Systemic Immune Responses During Acute and Chronic Bacterial Infections, Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université de Paris, Paris, France. ² Medical Intensive Care Unit, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, APHP, Centre, Paris, France. ³ Intensive Care Unit, Hôpital Hôtel-Dieu, Nantes, France. ⁴ Intensive Care Unit,

Hôpital Jean Minjot Hospital, Besançon, France. ⁵ Surgical Intensive Care Unit, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, APHP, Centre, Paris, France. ⁶ Intensive Care Unit, Centre Hospitalier Mémorial France Etats-Unis, Saint-Lô, France. ⁷ Intensive Care Unit, Centre Hospitalier Intercommunal Alençon Mamers, Alençon, France. ⁸ Department of Biostatistics and Epidemiology, Inserm UNIT 1018 CESP Oncostat Team, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France. ⁹ Intensive care unit, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France.

Received: 20 September 2020 Accepted: 18 January 2021

Published online: 29 January 2021

References

- 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(10223):497–506.
- Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RHH, Bergmans DCJJ, Camus C, Bauer TT, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(8):665–71.
- Litjós J-F, Gassama A, Charpentier J, Lambert J, de Roquetaillade C, Cariou A, et al. Pulmonary infections prime the development of subsequent ICU-acquired pneumonia in septic shock. *Ann Intensive Care*. 2019;9(1):39.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(3):260–8.
- Bhatraju PK, Ghassemieh BJ, Nichols M, Kim R, Jerome KR, Nalla AK, et al. Covid-19 in critically ill patients in the Seattle Region—case series. *N Engl J Med*. 2020;382(21):2012–22.
- Acute Respiratory Distress Syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 (cited 2020 May 29);307(23). <http://jamanetwork.com/artic le.aspx?doi=10.1001/jama.2012.5669>
- Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, Dauger S, Gibot S, et al. Pneumonies associées aux soins de réanimation* RFE commune SFAR–SRLF. Mootien J, Bretonnière C, editors. *Médecine Intensive Réanimation*. 2019;28(3):261–81.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Galandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008;46(12):1813–21.
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving sepsis campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med*. 2017;45(3):486–552.
- 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(1):69.
- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054–62.
- 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(5):846–8.
- on behalf of the coVAPid study Group, Rouzé A, Martin-Loeches I, Povoa P, Makris D, Artigas A, et al. Relationship between SARS-CoV-2 infection and the incidence of ventilator-associated lower respiratory tract infections: a European multicenter cohort study. *Intensive Care Med*. 2021(cited 2021 Jan 8). <http://link.springer.com/10.1007/s00134-020-06323-9>
- Razazi K, Arrestier R, Haudebourg AF, Benelli B, Carreaux G, Decousser J, et al. Risks of ventilator-associated pneumonia and invasive pulmonary aspergillosis in patients with viral acute respiratory distress syndrome related or not to coronavirus 19 disease. *Crit Care*. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03417-0>.
- Luyt C-E, Sahnoun T, Gautier M, Vidal P, Burrel S, de Chambrun PM, et al. Ventilator-associated pneumonia in patients with SARS-CoV-2-associated acute respiratory distress syndrome requiring ECMO: a retrospective cohort study. *Ann Intensive Care*. 2020;10(1):158.

16. COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network and the COVID-ICU Investigators. Clinical characteristics and day-90 outcomes of 4244 critically ill adults with COVID-19: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2020.
17. van Vught LA, Klein Klouwenberg PMC, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, et al. Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA.* 2016;315(14):1469–79.
18. 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(23):2594–605.
19. Payen D, Faivre 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. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4526-x>.

Publisher's Note

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

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

III. Article 3: Pulmonary and non-pulmonary sepsis differentially modulate lung immunity towards secondary bacterial pneumonia: a critical role for the alveolar macrophage

Jean-François Llitjos, Cédric Auffray, Edwige Péju, Zakaria Ait Hamou, Christophe Rousseau, Aurélie Durand, Clémence Martin, Jean-Paul Mira, Pierre-Régis Burgel, Jean-Daniel Chiche, Maha-Zohra Ladjemi, Bruno Lucas, Frédéric Pène

En cours de soumission

Nous avons observé que l'origine pulmonaire de l'infection initiale était associée de manière indépendante à une susceptibilité particulière aux PAVM au sein d'une population de chocs septiques. Ces données suggèrent que le sepsis entraîne une altération profonde des défenses pulmonaires envers une seconde agression infectieuse, les mécanismes qui contrôlent l'orientation et la profondeur de cette réponse immunitaire demeurent toutefois encore largement méconnus. Une limite majeure est l'absence de prise en compte du type d'infection initiale et de la compartimentalisation des réponses immunes susceptible de moduler le comportement des cellules immunes circulantes et résidentes du poumon. La modulation du site d'infection primaire apparaît donc comme une opportunité de modélisation originale de la réponse pulmonaire au cours de la phase d'immunosuppression post-septique.

Des souris C57BL/6J ont été soumises à une péritonite polymicrobienne par ligature ponction caecale (LPC) ou à une pneumonie bactérienne par instillation intra-trachéale d'*Escherichia coli*. Les contrôles respectifs consistaient en la réalisation d'une laparotomie simple et l'instillation de PBS. Sept jours après la première agression, il était réalisé chez les souris survivantes une instillation intra-trachéale de *Pseudomonas aeruginosa* (souche PAO1). En comparaison des contrôles, les souris post-LPC ont une susceptibilité accrue à une infection secondaire à *P.aeruginosa* avec une clairance bactérienne diminuée et une mortalité accrue (50% vs. 0%, $p < 0.05$). En revanche, toutes les souris post-pneumonies ont survécu et ont même présenté une clairance bactérienne plus rapide par rapport à

leurs témoins. La distribution des cellules immunitaires pulmonaires avant la seconde agression infectieuse (jour 7) montre une diminution des quantités absolue et relative des macrophages alvéolaires (MA) chez les souris post-LPC alors qu'elles augmentaient chez les souris post-pneumonies. Contrairement aux MA issus de souris post-LPC, les MA de souris post-pneumonie ont un niveau d'expression du CMH de classe II élevé, une signature transcriptomique orientée vers la défense antibactérienne et favorisent la prolifération des cellules T CD4 spécifiques de l'antigène. De plus, nous avons observé au 7^{ème} jour une augmentation en cellules T régulatrices (Treg) au sein des poumons de souris post-LPC par rapport aux souris témoins et post-pneumonie. Cette augmentation était dépendante des voies de signalisation TLR2. La déplétion des Treg médiée par CD25 avant la pneumonie à *P. aeruginosa* a restauré la survie et la clairance bactérienne chez les souris post-LPC. La déplétion des Tregs était associée à la restauration du nombre et des fonctions des MA issus de souris post-LPC.

Pulmonary and non-pulmonary sepsis differentially modulate lung immunity towards secondary bacterial pneumonia: a critical role for the alveolar macrophage

Jean-François Llitjos ¹, Cedric Auffray ¹, Edwige Péju ^{1,2}, Zakaria Ait Hamou ^{1,2}, Christophe Rousseau ¹, Aurélie Durand ¹, Clémence Martin ^{1,3}, Jean-Paul Mira ^{1,2}, Pierre-Régis Burgel ^{1,3}, Jean-Daniel Chiche ^{1,2}, Maha-Zohra Ladjemi ¹, Bruno Lucas ¹, Frédéric Pène ^{1,2}

Affiliations

1. Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université de Paris, Paris, France.
2. Service de Médecine Intensive et Réanimation, Hôpital Cochin, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris AP-HP. Centre & Université de Paris, Paris, France.
3. Service de pneumologie, Hôpital Cochin, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris AP-HP. Centre & Université de Paris, Paris, France.

Keywords

Trained immunity, alveolar macrophage, Sepsis-related immunosuppression, regulatory T cells, TLR2

Corresponding author

Prof. Frédéric Pène, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France.
frederic.pene@aphp.fr

Funding:

JFL was a recipient of a fellowship “Poste d’Accueil INSERM”.

EP was a recipient of a fellowship “Année-recherche interne-Université de Bourgogne”.

ZAH was a recipient of a fellowship “Année-recherche interne-Assistance Publique-Hôpitaux de Paris”

INTRODUCTION

Sepsis represents the systemic response to an infection and is a leading cause of intensive care unit (ICU) admission. Septic shock is the most severe presentation of sepsis and is associated with a high mortality rate (147). Thanks to antimicrobial treatments and organ failure supports, most patients with septic shock now survive the primary insult but then become highly susceptible to ICU-acquired infections (148). Ventilator-acquired pneumonia thereby accounts for a major cause of morbidity and mortality in septic patients (1). Interestingly septic shock patients with pneumonia exhibit a peculiar risk of ICU-acquired pneumonia, suggesting that a primary pulmonary insult may drive profound alterations in lung defence towards secondary infectious insults (149). Understanding the pathophysiological mechanisms responsible for this susceptibility

The immune pathophysiology of sepsis is viewed as a transient dysregulated overwhelming inflammatory response, followed by a complex and sustained immunosuppressive response related to quantitative and functional defects in both innate and adaptive immune cells. Sepsis-acquired immune dysfunctions have been associated with increased susceptibility to nosocomial infections in critically ill patients. Animal models of sepsis have reported defective lung defense towards superimposed infectious insults but the role of the primary source of infection on further impairment in lung defense has not been addressed. Clinical and experimental data consistently point to a major regulatory role of antigen-presenting cells in sepsis-induced immunosuppression. Monocyte deactivation is considered as a sound marker of susceptibility to ICU-acquired infections in septic patients, while dendritic cells have been involved in the regulation of post-septic lung defence in experimental models. However, it is noteworthy that few studies focused on alveolar macrophages despite their pleiotropic functions of frontline immune surveillance against pathogens, regulation of surfactant production as well as tissue healing.

These observations raise the question of the cellular and molecular mechanisms underlying the sepsis-induced alterations in lung immunity and the eventual susceptibility to superimposed infections. Modulation of the primary source of infection appears as an original and clinically relevant opportunity to address the

compartmentalization of lung response during sepsis-induced immunosuppression. The main goal of this research project is to address the impact of primary pulmonary or non-pulmonary infectious insult on lung immunity, most especially on the turnover and functions of alveolar macrophages.

MATERIAL AND METHODS

Mice

8 to 12 week-old mice of C57BL/6J background were used in all experiments. Wild-type mice were purchased from Janvier Laboratory. *Tlr2*^{-/-} mice were kind gift from Prof. Shizuo Akira (Osaka University, Japan). FoxP3-GFP-expressing mice were obtained from Dr Bernard Malissen (Centre d'immunologie Marseille-Luminy, France). OT-II mice (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn/Crl) were purchased from Charles River laboratory. All mice were housed under pathogen-free conditions at the animal facility of Cochin Institute. Female mice were used for this work except in experiments involving *Tlr2*^{-/-} mice. Mice were randomly assigned to experimental groups. Experiments were approved by the Paris Descartes University animal care and use committee (decision number #17-045). Mice were terminally euthanized by cervical dislocation for the collection of organs and tissues.

Bacteria

We used the *Escherichia coli* strain ATCC 25922, the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 and the *Klebsiella pneumoniae* strain KP SB2390. Bacteria were grown for 16 hours in Luria-Broth medium under shaking conditions (180 rpm) at 37°C, then washed twice in sterile phosphate buffered saline. Bacterial concentration was adjusted by spectrophotometry using a reference curve. The desired bacterial load was intratracheally instilled in a volume of 50 µL. The inoculum concentration was systematically verified by serial dilution quantification.

Sequential double-hit models

Mice were first subjected to either *E. coli* pneumonia or to polymicrobial peritonitis, or to their respective control procedures. Regardless of the primary insult, all mice were subsequently subjected to *P. aeruginosa* or *K. pneumoniae* pneumonia.

With regard to pneumonia, mice were briefly placed under general halogenated anesthesia (isoflurane, Aerrane) to receive an intrapulmonary instillation of a 50-µL bacterial solution through a tracheal cannula. Control mice received intratracheal instillation of 50 µL sterile PBS.

Polymicrobial peritonitis was induced by cecal ligation and puncture (CLP). Briefly mice were anesthetized by intra-peritoneal (i.p.) administration of ketamine (100

mg/kg) and xylazine (10mg/kg). The cecum was exposed, ligatured at its external third and punctured through and through by a 26-gauge needle. The incision was then sutured in layers and animals were resuscitated with i.p. injection of 1 mL sterile saline. Sham-operated mice underwent laparotomy with neither cecal ligation nor puncture. Six hours after surgery and the following 12 hours during the next 3 days, mice received i.p. saline resuscitation and injection of painkillers (buprenorphine 0.1µg per g bodyweight). Vital status and weight were evaluated daily using a composite score including external aspect, moving and drinking abilities, reactivity to handling and isolation from the group. Mice were euthanized if reaching predefined major disability.

Bacterial clearance

Lung clearance of *P. aeruginosa* was assessed through quantitative bacterial culture with serial dilution of lung homogenates (Ultra-Turrax homogenisers, IKA) in Luria-Bertani agar plates supplemented with 100mg/L amoxicillin-clavulanic acid in order to avoid growth of non-pseudomonal bacteria.

Cell isolation

After sternotomy, 20 mL PBS (GIBCO) were perfused in the right-sided heart in order to remove blood from vasculature. Lungs and spleen were excised and minced and incubated in medium containing 1mg/mL collagenase D (Sigma) and 0,1 mg/mL DNase I (Sigma) for 15 minutes at 37°C. Digested lungs and spleen were smashed and passed through a 40-µm cell strainer in PBS supplemented with 5% fetal calf serum (GIBCO), 0.1% NaN₃ (Sigma) and EDTA (2mM, Sigma).

Flow cytometry

Immune cell distribution was evaluated by flow cytometry. Cell suspensions were first incubated with Fc-blocker anti-CD16/32 antibody (dilution 1:20, Miltenyi Biotech) for 15 minutes, and then stained with fluorescent antibodies for 15 minutes at 4°C. Multicolor fluorescence was analyzed using a Fortessa cytometer (BD Biosciences) and analysis was performed using FlowJo software. Compensations were performed using UltraComp eBeads (In Vitrogen). Among viable cells, we identified the main myeloid cells as follows (figure S1A): alveolar macrophages (CD45⁺ CD11c⁺ CD11b⁻ SiglecF^{high}), polymorphonuclear cells (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G^{high}), Ly6C^{high} monocytes

(CD45⁺ CD11b⁺ Ly6C^{high}), Ly6C^{low} monocytes (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6C^{int} MHCII⁺ F4/80⁺). Lymphoid subsets were identified as follows (figure S1B): B lymphocytes (CD45⁺ CD19⁺ TCRβ⁻), CD4⁺ T cells (CD45⁺ CD19⁻ TCRβ⁺ CD4⁺ CD8⁻), CD8⁺ T cells (CD45⁺ CD19⁻ TCRβ⁺ CD4⁻ CD8⁺) and Natural Killer cells (CD45⁺ NK1.1⁺ TCRβ⁻).

In addition, cells were permeabilized by FoxP3 staining buffer (eBioscience) and stained for intracellular transcription factors.

Flow cytometry antibodies

Ly6G-APC (clone 1A8), SIRPα-APC (clone P85), CD200R-AF647 (clone OX-110), SiglecF-AF647 (clone E50-2440), Vβ5.1,5.2-PE (clone MR9-4), CD11c-PECy7 (clone HL3), NK1.1-PerCpCy5.5 (clone PK136), CD64-bv650 (clone X54-5/7.1), SiglecF-PECF594 (clone E50-2440), CD45.2-bv711 (clone 1D4), Ly6G-bv786 (clone 1A8), CD4-Pacific Blue (clone RM4-5), CD11c-bv605 (clone HL3), Ly6C-bv421 (clone AL-21), CD4-bv510 (clone RM4-5), TLR2-AF647 (clone 6C2), FoxP3-PE (clone MF23), CD19-APC (clone 1D3), GATA3-PE (clone L50-823) were purchased from Becton-Dickinson. Cx3CR1-AF647 (clone SAO11F11), CCR2-AF647 (clone SA203611), MHCII-AF647 (clone M5/114.15.2), CD86-APCCy7 (clone GL-1), CD115-PE (clone AFS98), CD80-PE (clone 16-10A1), Ly6C-bv421 (clone HK1.4), TLR4-APC (clone 1D3), CCR6-bv421 (clone 29-2L17) were purchased from BioLegend. CD11b-FITC, F4/80-PE, RORγt-PE, Tbet-APC and CD8-APCvio770 were purchased from Miltenyi Biotec.

anti-CD25 (7D4)

Isolation of alveolar macrophages

Successive bronchoalveolar lavage (BAL) collections of 1 mL (up to a total of 5 mL) were collected. The BAL fluid was subjected to CD11c-positive immunomagnetic selection (Miltenyi) resulting in purity > 90%.

Microarrays

CD11c-positive alveolar macrophages were purified as previously described. Total RNA was extracted using the total RNA purification kit (Norgen Biotek Corp). After validation of the RNA quality with Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 pico chip kit), 3 ng of total RNA was reverse transcribed following the Ovation PicoSL WTA System V2 (Tecan). The resulting double strand cDNA was used for

amplification based on SPIA technology. After purification according to Tecan protocol, 3.6 ug of Sens Target DNA are fragmented and biotin labelled using Encore Biotin Module kit (Tecan). After control of fragmentation using Bioanalyzer 2100, cDNA is then hybridized to GeneChip® ClariomS Mouse (Affymetrix) at 45°C for 17 hours. After overnight hybridization, chips are washed on the fluidic station FS450 following specific protocols (Affymetrix) and scanned using the GCS3000 7G. The scanned images are then analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (cel files) and metrics for Quality Controls. RNA normalization is performed using TAC4.0 software (Thermofisher) and statistical analysis was performed with Partek Genomic Suite 7.0 software. Analysis of the data was performed using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using the javaGSEA Desktop application using phenotype permutation, Ratio_of_Classes as a ranking metric and the weithed scoring scheme. To generate heatmpas, we used R software (with the *gplots* and *RcolorBrewer* packages). For the PCA analysis, we used R with the following packages: *FactoMineR* and *Factoextra*.

CD4⁺ T cells and regulatory T cells (Tregs) depletion

Mice were intravenously injected with anti-CD4 and anti-CD25 (clone PC61) antibodies (BioXCell) at days 1, 3 and 6 after the first hit. Tregs depletion was checked in splenocytes by flow cytometry.

Whole-lung cytokine measurement

Cytokine production was assessed by RT-qPCR and ELISA. After whole lung removal, RNA was extracted and purified using the total RNA purification kit (Nogen Biotech Corp). cDNA was synthesized using the protocol RevertAid H-Minus M-MuLV (Fermentas). mRNA levels of target genes (*Il10*, *Tnfa*, *Il6* and *Il33*) and *Sdha* (Succinate dehydrogenase complex subunit A) reference gene were quantified by real-time PCR using the protocol LightCycler 480 SybRGreen I Master (Roche) and gene-specific primers. Gene expression was expressed as normalized relative quantity (NRQ) = $2^{\Delta\Delta Ct}$ where Δ cycle threshold (ΔCt) = $Ct_{target} - Ct_{SDHA}$ for each individual sample. IL-33, TNF α , IL-6 and IL-10 protein levels were assessed using ELISA (R&D Systems).

Phagocytosis assay

Pseudomonas aeruginosa was grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C shaken at 180 rpm for 16 hours, and then incubated for 30 minutes with pHrodoRed-SE dye (Life Technologies) in 100mM NaHCO₃ at room temperature. pHrodoRed-SE-labeled *P. aeruginosa* were intratracheally instilled to mice. The uptake of pHrodoRed-SE-labeled *P. aeruginosa* by CD45⁺SiglecF⁺CD11c⁺ lung cells was evaluated by flow cytometry using.

OT-II proliferation assay

AM from various experimental conditions were positively selected through CD11c expression. OT-II CD4 T cells were purified from lymph nodes of transgenic Ly5.1+ mice by both negative selection and FACS sorting (ARIA, BD), and were labeled with Cell Trace Violet (CTV, Invitrogen). 10⁶ CTV-labeled OT-II CD4⁺ T cells were plated in 96-well plate with or without ³²³⁻³³⁹ova peptide (Sigma-Aldrich) at 15 μmol/L, and cultured at 37°C for 60 hours in the presence of 10⁵ alveolar macrophages. The proliferation of CTV-labeled cells was assessed by dye dilution in flow cytometry.

Statistical analysis

Data were plotted using GraphPad Prism software. Survival curves were represented using the Kaplan-Meier method and were compared by the log-rank test. Continuous data were shown as scatterplots or mean±SD and compared by Kruskal-Wallis non-parametric test with Dunn's multiple comparison test, unpaired t-test and Mann-Whitney U test.

RESULTS

Impact of non-pulmonary and pulmonary sepsis on susceptibility to secondary bacterial pneumonia

In order to address the differential impact of non-pulmonary and pulmonary sepsis on lung immunity, we developed double-hit animal models where mice first subjected to polymicrobial peritonitis or to *E. coli* pneumonia were secondarily subjected to Gram-negative bacterial intrapulmonary challenge (**Figure 1A**). Following the primary insult, mice subjected to polymicrobial peritonitis and *E. coli* pneumonia exhibited similar weight loss and mortality rates, all deaths occurring within 7 days (**figure S2A and S2B**).

When compared to sham-operated mice, post-CLP mice exhibited higher mortality towards secondary *P. aeruginosa* (figure 1B and S2C) or *K. pneumoniae* pneumonia (figure S2D). In contrast, post-pneumonia mice were resistant to secondary *P. aeruginosa* pneumonia when compared to post-PBS mice (**figure 1B**). Accordingly, 24-h and 48-h lung clearance of *P. aeruginosa* were impaired in post-CLP mice while improved in post-pneumonia animals (**Figure 1C**).

These results suggest that post-septic anti-infective lung response rely on the primary source of infection, non-pulmonary and pulmonary sepsis being respectively associated with hypersusceptibility or resistance to secondary *P. aeruginosa* pneumonia.

Distribution of lung immune cells after non-pulmonary or pulmonary sepsis

We analyzed the amounts and distribution of lung myeloid and lymphoid cells at different time points (days 1, 3 and 7) following the primary insult, prior to secondary *P. aeruginosa* challenge. Immune cell distribution was similar in both sham-operated and PBS-challenged control mice. In contrast, non-pulmonary and pulmonary sepsis differentially modulated the distribution of lung immune cells (**figure 2A and 2B**). Pulmonary bacterial infection resulted in major but transient neutrophil recruitment at day 3 that was resolved at day 7. Ly6C^{high} lung monocytes increased in both post-septic conditions, albeit delayed in post-CLP mice. The amounts of CD45⁺CD11c⁺Siglec-F^{high} alveolar macrophages dropped early in both

CLP-operated and *E. coli*-challenged mice, but remained low in post-CLP mice while dramatically increased later on in post-pneumonia mice (**figures 2B and 2C**). Early loss in alveolar macrophages was related to a predominant apoptotic mechanism in CLP-operated mice while related to necrosis in *E. coli*-challenged mice (**figure S4A**). In order to address whether changes in lung myeloid cells are organ-specific, we addressed the behaviour of myeloid cells within the spleen of post-septic and control animals (**figure S3A and S3B**). It is noteworthy that *E. coli* pneumonia had little or no impact on myeloid cell distribution in the spleen. In contrast CD11c-CD11b⁺Ly6G⁻F4/80⁺ macrophages, Ly6C^{high} monocytes and PMN cells transiently increased at day 3 in the spleen from post-CLP mice (**figure S3B**). Non-pulmonary and pulmonary insults also altered the distribution of lung lymphoid cells since B-cells and T-cells tended to decrease in CLP-operated mice while increased in post-pneumonia mice (**figures 2B and 2C**).

In summary, lung responses towards non-pulmonary and pulmonary sepsis appear markedly different and compartmentalized. Sustained post-CLP depletion and post-pneumonia reexpansion in alveolar macrophages suggest their involvement in response towards secondary *P. aeruginosa* pneumonia.

Functions of alveolar macrophages after non-pulmonary or pulmonary sepsis

Alveolar macrophages harbor various functions of phagocytosis of pathogens (79), release of inflammatory mediators and antigen processing and presentation. Transcriptomic assessment provides a global and comprehensive view of cellular functions. We addressed the transcriptomic response of alveolar macrophages obtained for animals subjected to sham surgery, CLP, PBS i.t. challenge or *E. coli* i.t. challenge seven days ago. Using gene set enrichment analysis (GSEA) and the curated C5 gene set collection from the MSigDB (7474 gene sets), we observed enrichment in several pathways involving detection of stimulus and antigen-T receptor interaction (FDR<25% and p-value≤0.001) (**figure S5A**). Principal component analysis (PCA) of the whole dataset showed that post-CLP AM differentially clustered from sham-operated, post-pneumonia and post-PBS AM (**figure S5B**). The numbers of both downregulated and upregulated differentially expressed genes (DEG) were higher between post-CLP and post-pneumonia

alveolar macrophages (**figure S5C**). GSEA analysis (curated C5 gene set collection) retrieved gene enrichment in lipid metabolism and interferon response pathways in post-pneumonia AM when compared to post-CLP AM (**Figure 3A & B**). Ingenuity Pathways Analysis (IPA) revealed downregulation of pathways involved in cytokine signaling and infection response pathways in post-CLP compared to post-pneumonia alveolar macrophages (**figure S5D**).

We specifically addressed the hallmark functions of phagocytosis and antigen presentation in alveolar macrophages. Phagocytosis could be addressed thanks to bacterial tracing with dye pHRedoRed-SE that binds to bacterial cell wall and exhibits fluorescence under low-pH environment of lysosomes. We intratracheally inoculated post-CLP and post-pneumonia mice with pHRedoRed-SE-labeled *P. aeruginosa*. Alveolar macrophages accounted for the main cell subset engulfing labeled bacteria (**Figure 3**). Absolute numbers of phagocytic macrophages were decreased in post-CLP mice, whereas increased in post-pneumonia mice. However, relative proportions of phagocytic macrophages as well as fluorescence intensities were higher in post-CLP than in post-pneumonia mice (**Figure 3**). This was consistent with the differential expressions of signal-regulatory protein α (SIRP α) onto post-CLP and post-pneumonia alveolar macrophages, with respect to its inhibitory functions on phagocytosis (**figure 3**)(150). Therefore, differences in lung bacterial clearance in post-septic mice appear to be relying on the numbers of alveolar macrophages but not on acquired functional defects.

Alveolar macrophages from day-7 post-CLP mice exhibited decreased MHC2 surface expression as compared to post-pneumonia AM (**Figure 3**) Expressions of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 remained similar across all four experimental conditions. We assessed the capacity of alveolar macrophages to prime OT-II CD4 T-cells expressing ova₃₂₃₋₃₃₉-restricted TCR in the presence of ova₃₂₃₋₃₃₉ peptide. Sham-operated, post-PBS and post-pneumonia alveolar macrophages displayed similar potent capacities to prime OT-II proliferation. OT-II proliferation was markedly attenuated in the presence of post-CLP alveolar macrophages (**Figure 3**).

Besides quantitative changes, these results suggest that non-pulmonary or pulmonary source of infection skew alveolar macrophages towards paralyzed or trained functional status, respectively.

Transcriptomic response of alveolar macrophages towards *P. aeruginosa*

We addressed the transcriptomic patterns of alveolar macrophages harvested 24 hours after secondary *P. aeruginosa* i.t. challenge in post-septic and control mice. Principal component analysis of the whole dataset showed that post-CLP and post-pneumonia macrophages clustered apart whereas controls clustered closer (**figure 4A**). We found 681 DEG between post-CLP and post-PBS macrophages, and 918 DEG between post-pneumonia and post-PBS macrophages (**figure 4B**). Using gene Ontology (GO) analysis, DEG in post-CLP macrophages were involved in several pathways, especially decreased innate immune response and response to IFN γ (**figure 4C and S6A**). Ingenuity Pathways Analysis (IPA) highlighted similar major changes in pathways in post-CLP macrophages (**figure 4D and S6B**). In post-pneumonia alveolar macrophages, GO analysis identified the involvement of DEG in several metabolic processes (**figure S6A**). This was confirmed by the IPA analysis of the whole dataset, which highlighted the activation of pathways involved in cholesterol biosynthesis (**figure 4D and S6B**). Therefore, these results suggest that the source of primary infection can differentially set the metabolism and the further anti-infective response of alveolar macrophages.

Immunomodulatory functions of Tregs in post-septic lung defence

CD4 T cells are central regulators of anti-infective immune responses. As also mentioned above (figure 2C), the primary source of infection altered the numbers of lung CD4 T-cells, which were decreased in post-CLP mice and increased in post-pneumonia mice (**Figure S7A**). Among CD4⁺ T cells, the proportion of CD44⁺ CD62L⁻ effector memory T cells was higher in post-pneumonia mice (**Figure S7A**). We assessed the distribution of lung CD4⁺ subsets through intra-cellular expression of the master transcription factors Tbet, GATA3, ROR γ T, FoxP3 for the identification of T-helper (Th)-1, Th-2, Th-17 and T-regs lymphocytes, respectively (**figure S7B**). It is noteworthy that CD4 T-cell depletion in post-CLP lungs was nonetheless

associated with a relative increase in T-regs (**Figure 5A**). The relative proportions of CD44⁺CD62L⁻ and CD44⁻CD62L⁺ Tregs as well as expressions of FoxP3, Tbet, and ROR γ t within T-regs remained similar across all four experimental conditions (**figure S7C & S7D**). Among CD44⁺ CD62L⁻ effector memory CD4⁺ T cells (T_{EM}), proportions of Th2 and Th17 lymphocytes were respectively decreased and increased in post-CLP lungs (**Figure 5A**).

In order to address the role of Tregs in post-septic lung defence, mice subjected to the primary insult were administered anti-CD4 or anti-CD25 depleting antibodies prior to secondary *P. aeruginosa* pulmonary challenge. Neither CD4 nor CD25 depletion altered bacterial clearance of *P. aeruginosa* in post-PBS and sham-operated mice. In contrast, both CD4 and CD25 depletion improved *P. aeruginosa* clearance in post-CLP mice. CD25 depletion conversely impaired *P. aeruginosa* clearance in post-pneumonia mice (**Figure 6A**). CD25 depletion restored the number of total alveolar macrophages as well as the number of phagocytic macrophages in post-CLP mice (**Figure 6C and 6D**). Tregs depletion has little effect on MHC-II and CD200R membrane expression, albeit with a trend towards increased expression in post-pneumonia alveolar macrophages (**Figure 6E**).

In summary, post-CLP depletion in alveolar macrophages is driven by the relative expansion in Treg, suggesting that Tregs regulates the myeloid compartment in post-septic lungs.

Tlr2-dependent regulation of post-septic lung

We previously reported that Tlr2 deficiency prevents the acquired susceptibility to secondary *P. aeruginosa* pneumonia in post-CLP mice (151). We confirmed this observation through improved survival and improved *P. aeruginosa* clearance in post-CLP *Tlr2*^{-/-} mice (**figure 6A and 6B**). Interestingly, preservation of antibacterial lung defence in post-CLP *Tlr2*^{-/-} mice was associated with restoration of Tregs and alveolar macrophages proportions. (**figure 6C and 6D**). These results suggest that TLR2 drives post-septic Tregs expansion and the eventual depletion in alveolar macrophages in lungs from post-CLP mice.

DISCUSSION

In this study based on clinically-derived double-hit models, the source of a primary infection, either pulmonary or non-pulmonary, profoundly modulates lung defence towards a secondary infectious insult. A primary bacterial pneumonia improved anti-infective lung responses through fast reconstitution of trained alveolar macrophages with readily potent phagocytic activity. In contrast, polymicrobial peritonitis impaired anti-infective lung response through Tlr2-dependent expansion of Tregs that sustained sepsis-induced depletion in alveolar macrophages. In contrast,

This experimental study arose from the clinical observation that patients with septic shock related caused by pneumonia exhibited a particular susceptibility towards secondary ICU-acquired pneumonia, after adjustment with confounding factors including time under invasive mechanical ventilation. This suggested that a primary pulmonary infection specifically impairs lung immunity resulting in defective response towards secondary infectious insults. We attempted to mimic those common clinical situations in double-hit experimental models of non-pulmonary vs. pulmonary sepsis followed by Gram-negative bacterial pneumonia. Unexpectedly, we observed opposite impacts on susceptibility to superimposed pulmonary infections: post-CLP mice became susceptible whereas post-pneumonia mice became resistant to secondary lung challenge. A number of factors may account for this apparent discrepancy, related to both the primary and the secondary insults. Experimental peritonitis is contained through the constitution of intra-abdominal abscesses, likely to sustain a protracted inflammatory process, whereas resolution of bacterial pneumonia usually relies on fast bacterial clearance. Experimental pneumonia lacks the common pathophysiological features of ventilator-acquired pneumonia related to the presence of the endotracheal tube and the frequent tracheobronchial bacterial colonization prior to the development of pneumonia.

Sepsis-induced immunosuppression is related to various quantitative and functional immune defects in most innate and adaptive immune cells, including deactivation of monocyte with reduced expression of HLA-DR, apoptosis of T-cell and B-cell lymphocytes, depletion of innate-like T cells, expansion of regulatory T cells, apoptosis and functional abnormalities in dendritic cells (25). Owing to

convenient accessibility, assessment of immune dysfunctions is mostly limited to circulating cells in septic patients. As of today, assessment of HLA-DR expression onto monocytes is the most robust biomarker to predict the development of ICU-acquired infections in critically ill patients. Whether monocyte deactivation reflects the behaviour of resident macrophages within organs is questionable with respect to the compartmentalization of inflammatory responses and the functional specialization of tissular macrophages. A comprehensive assessment of macrophage numbers, origin and transcriptomic responses to various injuries (CLP, stroke and myocardial infarction) identified both organ- and injury-specific macrophage responses (5). However, neither the source of sepsis nor the eventual susceptibility to secondary infections was addressed.

Alveolar macrophages are pivotal innate immune cells localized at the alveolar mucosal surface. Owing to their unique localization, they exert important sentinel and anti-pathogens functions in close communication with a unique environment (98). We observed different time courses in the numbers of alveolar macrophages between post-CLP mice and post-pneumonia mice. Both primary non-pulmonary and pulmonary insults resulted in early depletion in alveolar macrophages, that was sustained in post-CLP mice whereas rapidly reversible in post-pneumonia animals. Differential *P. aeruginosa* lung clearance across models could be mainly related to differences in numbers of alveolar macrophages, but not to phagocytic dysfunctions. Emerging evidences report different abundance of tissue macrophages after remote various insults including myocardial infarction, stroke or sepsis, the amplitude and direction varying depending on tissue localization and type of injury (5). Alveolar macrophages are of embryonic origin and turn over slowly under homeostatic physiological conditions independently of circulating monocytes (81–84). Under inflammatory conditions, alveolar macrophages are maintained either independent from monocytes (83,94,150) or with the contribution of circulating monocytes (91,92). Cross-protection or susceptibility to secondary infections suggests post-infective modifications in immune cells. This assumption has led to the recent emergence of the innate immune memory concept (145). In recent years, emerging evidences have highlighted the capacity of innate immune cells such as natural killers and macrophages to develop long-term innate immune memory, leading to tolerance or enhanced protection against extrinsic agents. Such functional changes mostly rely on

epigenetic reprogramming (145). In the lung, trained memory alveolar macrophages are characterized by high MHC-II expression, a defense-ready gene signature and increased lipid metabolism (94). We observed similar profile in post-pneumonia alveolar macrophages but an opposite profile among post-CLP alveolar macrophages, suggesting that local infection favors trained immunity whereas remote infection induces tolerance.

We identified a cross-talk between Tregs and alveolar macrophages, highly dependent on the type of primary insult. After CLP, Treg depletion in CLP-operated mice increased the number of alveolar macrophages and improved bacterial clearance. This is accordance with a study where Treg-depleted mice display increased numbers of immune cells including alveolar macrophage after LPS intratracheal administration (152). Conversely, Treg depletion induced bacterial clearance comparable to controls with decreased AM numbers. The role of Tregs in infections is complex since has been ascribed to both harmful and beneficial effects. On one hand, Tregs may drive inappropriate anti-infective immune responses through the IL-33-mediated expansion of type 2 innate lymphoid cells (29) and TGF β -mediated tolerogenic differentiation of dendritic cells (146). On the other hand, Tregs expansion may promote resolution of lung injury through TGF β -dependent lung epithelium proliferation via amphiregulin expression (152,153). Studies specifically investigating the relations between alveolar macrophages and Tregs in various infectious insults reported in turn the advantageous induction of Tregs by alveolar macrophages (154,155).

Tlr2 is a broad-spectrum pattern recognition receptor through heterodimerization with either Tlr1 or Tlr6, thereby able to sense multiple pathogens including both Gram-positive and Gram-negative bacteria. We previously identified an intriguing role of TLR2 in the regulation of sepsis-induced immunosuppression (151). We herein confirmed that *Tlr2*^{-/-} mice subjected to polymicrobial peritonitis displayed resistance to secondary *P. aeruginosa* pneumonia. Although *P. aeruginosa* can stimulate Tlr2 in vitro, Tlr2 is dispensable to mount an appropriate lung response to primary *P. aeruginosa* pneumonia (151). Tlr2 deficiency prevented both the

expansion of pulmonary Tregs and the depletion in alveolar macrophages induced by polymicrobial peritonitis. TLR, especially TLR2 are known to have direct and indirect effects on Tregs. The expansion of Tregs is dependent on TLR2 (156), and Tregs can thus expand without antigen-presenting cells and transiently lose their suppressive abilities in the presence of the TLR2 agonist Pam3Cys-SK4 (157). In addition, Tregs functions are regulated by cytokines produced by TLR-activated dendritic cells (158).

CONCLUSION

The source of sepsis has a major impact on susceptibility towards superimposed pulmonary infectious insults, thereby highlighting the heterogeneity of septic responses on lung immunity. This study provides evidence for a cross-talk between Tregs and alveolar macrophages in the setting of acute inflammation. With respect to the burden of nosocomial pneumonia, a better comprehension of lung defence may feed innovative immunomodulatory therapeutic insights. However, the limited translation between experimental infection models and human sepsis calls for caution for any attempt to manipulate lung immunity.

References

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
2. Jamme M, Daviaud F, Charpentier J, Marin N, Thy M, Hourmant Y, et al. Time Course of Septic Shock in Immunocompromised and Nonimmunocompromised Patients. *Crit Care Med*. 2017 Dec;45(12):2031–9.
3. van Vught LA, Klein Klouwenberg PMC, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, et al. Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA*. 2016 Apr 12;315(14):1469–79.
4. Llitjos J-F, Gassama A, Charpentier J, Lambert J, de Roquetaillade C, Cariou A, et al. Pulmonary infections prime the development of subsequent ICU-acquired pneumonia in septic shock. *Ann Intensive Care*. 2019 Mar 15;9(1):39.
5. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016 Mar;44(3):439–49.
6. Roquilly A, Jacqueline C, Davieau M, Mollé A, Sadek A, Fourgeux C, et al. Alveolar macrophages are epigenetically altered after inflammation, leading to long-term lung immunoparalysis. *Nat Immunol*. 2020;21(6):636–48.
7. Pène F, Grimaldi D, Zuber B, Sauneuf B, Rousseau C, El Hachem C, et al.

- Toll-like receptor 2 deficiency increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the setting of sepsis-induced immune dysfunction. *J Infect Dis.* 2012 Sep 15;206(6):932–42.
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 Dec 21;306(23):2594–605.
 9. Hoyer FF, Naxerova K, Schloss MJ, Hulsmans M, Nair AV, Dutta P, et al. Tissue-Specific Macrophage Responses to Remote Injury Impact the Outcome of Subsequent Local Immune Challenge. *Immunity.* 2019 Nov;51(5):899-914.e7.
 10. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol.* 2014 Feb;14(2):81–93.
 11. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity.* 2013 Jan;38(1):79–91.
 12. Guillemins M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med.* 2013 Sep 23;210(10):1977–92.
 13. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* 2013 Apr 18;38(4):792–804.
 14. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity.* 2013 Sep;39(3):599–610.
 15. Yao Y, Jeyanathan M, Haddadi S, Barra NG, Vaseghi-Shanjani M, Damjanovic D, et al. Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell.* 2018 Nov;175(6):1634-1650.e17.
 16. Machiels B, Dourcy M, Xiao X, Javaux J, Mesnil C, Sabatel C, et al. A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat Immunol.* 2017 Dec 1;18(12):1310–20.
 17. Aegerter H, Kulikauskaite J, Crotta S, Patel H, Kelly G, Hessel EM, et al. Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nat Immunol.* 2020 Feb;21(2):145–57.
 18. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 2016 Apr 22;352(6284):aaf1098–aaf1098.
 19. Mock JR, Garibaldi BT, Aggarwal NR, Jenkins J, Limjunyawong N, Singer BD, et al. Foxp3+ regulatory T cells promote lung epithelial proliferation. *Mucosal Immunol.* 2014 Nov;7(6):1440–51.
 20. Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, Ferreira RG, Colón DF, Donate PB, et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nat Commun.* 2017 Apr 4;8:14919.
 21. Roquilly A, McWilliam HEG, Jacqueline C, Tian Z, Cinotti R, Rimbart M, et al. Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity.* 2017 18;47(1):135-147.e5.
 22. Arpaia N, Green JA, Molteni B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell.* 2015 Aug;162(5):1078–89.
 23. Soroosh P, Doherty TA, Duan W, Mehta AK, Choi H, Adams YF, et al. Lung-

resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med*. 2013 Apr 8;210(4):775–88.

24. Coleman MM, Ruane D, Moran B, Dunne PJ, Keane J, Mills KHG. Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Jun;48(6):773–80.

25. Suttmuller RPM, den Brok MHMGM, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LWJ, Kullberg B-J, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2006 Feb;116(2):485–94.

26. Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 2;103(18):7048–53.

27. Kubo T, Hatton RD, Oliver J, Liu X, Elson CO, Weaver CT. Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Dec 15;173(12):7249–58.

Figure legends

Figure 1: Characterization of the pulmonary and extra-pulmonary double-hit models

A: Description of double-hit experimental outlines. Mice were subjected to primary non-pulmonary sepsis through polymicrobial peritonitis induced by caecal ligation and puncture (CLP) or to pulmonary sepsis through intratracheal (i.t.) instillation of $5 \cdot 10^6$ *Escherichia coli*. Controls were subjected to laparotomy without CLP (sham surgery) or i.t. PBS instillation, respectively. Seven days after the primary insult, post-septic and control mice were subjected to i.t. administration of *Pseudomonas aeruginosa*.

B: Survival of post-CLP and sham-operated mice (left panel) and in post-pneumonia and post-PBS mice (right panel) following secondary *P. aeruginosa* i.t. administration ($5 \cdot 10^6$ CFU) (n=10 mice per group).

C: Lung bacterial load 24h and 48h after i.t. instillation of 10^6 *P. aeruginosa* (n=6-8 per group).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Graphs are pooled from 2 independent experiments.

Figure 2: Distribution of immune cells in lungs after primary non-pulmonary and pulmonary sepsis

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration). Cell distribution in the lung was analyzed by flow cytometry.

A: Time course of lung immune cell counts following the primary insult in post-CLP (black line), sham-operated (black dashed line), post-pneumonia (red line) and post-PBS mice (red dashed line) (n=4-10 mice per group and per time point). Cell counts are pooled from 2 independent experiments and are expressed as mean \pm SD.

B: T-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) plots showing the normalized expression of the main markers of the monocyte/macrophage lineage overlaid on T-SNE plots in lungs from mice at day 7 after the primary insult.

C: Distribution of immune cells in lungs from mice at day 7 after the primary insult. Proportions are shown as percentage of CD45⁺ cells.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 3: Non-pulmonary and pulmonary sepsis differentially modulate the phenotype of alveolar macrophages.

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration). Seven days after, alveolar macrophages were sorted by flow cytometry for functional assessments.

A: Significantly (FDR<25%, q-value≤0.001) dysregulated pathways using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) between alveolar macrophages from post-pneumonia, post-PBS and post-sham-operated mice compared to alveolar macrophages from post-CLP mice (n=3 post-CLP and post-pneumonia mice and n=2 sham-operated and post-PBS controls). Pathways are ranked according to their Normalized Enrichment Score (NES) value.

B: Gene set enrichment analysis (GSEA) of the gene sets GO PHOSPHOLIPID_TRANSPORT and GO RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA in post-pneumonia vs. post-CLP alveolar macrophages. FDR are calculated by gene set permutation.

C: Expressions of molecules involved in antigen-presenting functions (MHCII, CD80 and CD86), phagocytosis (SIRPα) and regulation of activation signals (CD200R and Siglec-F) in alveolar macrophages from mice at day 7 from the primary insult (n=6-9 mice per conditions).

D: Distribution of phagocytic CD45⁺ cells in lungs of mice 12 hours after i.t. administration of pH-RodoRed-SE-labeled *P. aeruginosa* (10⁶ CFU) (n=5-6 mice per group).

E: Proportions of phagocytic cells among alveolar macrophages (n=5-6 mice per group).

F: pH-RodoRed-SE fluorescence intensity in alveolar macrophages.

G: Naive cell-trace violet (CTV)-labeled OT-II cells were cultured for 60h at a 10:1 ratio with alveolar macrophages from mice at day 7 from the primary insult, in the presence of ova₃₂₃₋₃₃₉ peptide (15 µg/mL). Dividing OT-II cells were identified through dye dilution. Data are representative of two independent experiments.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 4: Transcriptomic analysis in alveolar macrophages during secondary *P. aeruginosa* pneumonia.

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration), and subjected to secondary *P. aeruginosa* i.t. instillation at day 7. 24h after *P. aeruginosa* i.t. challenge, alveolar macrophages were sorted by flow cytometry for transcriptomic analysis.

A: Principal component analysis (PCA) using transcript abundance of genes in alveolar macrophages (n=3 in each group).

B: Venn diagram of gene expressions between alveolar macrophages from post-CLP, sham-operated and post-pneumonia mice compared to post-PBS alveolar macrophages. Genes are depicted if significantly upregulated and downregulated ($FC > 2$ and $p\text{-value} < 0.05$).

C: Hierarchical clustering and heatmaps of genes related to lipid metabolic process (GO:0006629), innate immune response (GO: 0045087) and response to interferon gamma (GO:0034341) in alveolar macrophage.

D: Radar map depicting the 10 ten most significantly dysregulated pathways between post-CLP and post-PBS alveolar macrophages (left panel) and between post-pneumonia and post-PBS alveolar macrophages (right panel). Represented values are $-\log_{10}$ (B-H) calculated using IPA (Ingenuity Pathways Analysis, QIAGEN*). Of note, we represented the values from others groups on each panel.

Figure 5: Remote polymicrobial sepsis increases the proportion of FoxP3⁺ Tregs in the lung

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration).

A: CD4⁺ T cells subsets were analysed in the lung at day 7 from the primary insult. Tregs were identified as CD45⁺ TcRβ⁺ CD4⁺ CD8⁻ FoxP3⁺ cells and were expressed as percentage of CD4⁺ T cells. TH1, TH2 and TH17 lymphocytes were identified as CD45⁺ TcRβ⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD44⁺ CD62L⁻ T-bet⁺ GATA3⁻ cells, as CD45⁺ TcRβ⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD44⁺ CD62L⁻ T-bet⁻ GATA3⁺ cells and as CD45⁺ TcRβ⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD44⁺ CD62L⁻ T-bet⁻ GATA3⁻ RORγt⁺ cells, respectively, and expressed as percentages of effector memory T cells. Figures are representative of two independent experiments (n=7-9 per group).

B: Mice were treated or not with anti-CD4 or anti-CD25 depleting antibodies at days 1, 3 and 6 following the primary insult, and then i.t. challenged with 10^6 *P. aeruginosa* at day 7. Lung bacterial load was assessed at 24h after *P. aeruginosa* challenge (n=5-10 per group).

C: Mice were treated or not with anti-CD25 depleting antibody at days 1, 3 and 6 following the primary insult. Distribution of alveolar macrophages, PMN and Ly6C^{hi} monocytes in the lung was analyzed by flow cytometry at day 7. Results are representative of two independent experiments with n= 4-6 mice per group.

D: Mice were treated or not with anti-CD25 depleting antibody at days 1, 3 and 6 following the primary insult and then i.t. challenged with 10^6 pH-RodoRed-SE-labeled *P. aeruginosa* at day 7. Numbers of phagocytic alveolar macrophages were assessed by flow cytometry 12h after *P. aeruginosa* challenge. Results are representative of two independent experiments (n= 4-6 mice per group).

E: Mice were treated or not with anti-CD25 depleting antibody at days 1, 3 and 6 following the primary insult. Expression of MHCII and CD200R onto alveolar

macrophages was analyzed by flow cytometry at day 7. Results are representative of two independent experiments (n= 4-5 mice per group).

Figure 6: Tlr2 modulates the sepsis-related lung distribution in Tregs and alveolar macrophages

WT and *Tlr2*^{-/-} mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration), and subjected to secondary i.t. instillation of 10⁶ *P. aeruginosa* at day 7.

A: Survival of WT (left panel) and *Tlr2*^{-/-} (right panel) mice to secondary *P. aeruginosa* pneumonia (n=10 mice per group).

B: Lung bacterial load in WT and *Tlr2*^{-/-} mice 24h after secondary i.t. instillation of *P. aeruginosa* (n=3-7 mice per group).

C: Proportions of Tregs (CD45⁺ TcRβ⁺ CD4⁺ CD8⁻ FoxP3⁺) among CD4⁺ T cells in the lung from WT and *Tlr2*^{-/-} mice at day 7 from the primary insult. (n=3-4 mice per group).

D: Proportions of alveolar macrophages (CD45⁺ CD11c⁺ Siglec-F^{high}) among CD45⁺ cells in the lung from WT and *Tlr2*^{-/-} mice at day 7 from the primary insult. (n=5-8 mice per group).

Supplementary Figures

Supplementary figure 1

Flow cytometry gating strategy used to identify lymphoid (**A**) and myeloid cell subsets (**B**) in the lung.

Supplementary figure 2

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration).

A: Survival of mice after CLP (n=8), *E. coli* pneumonia (n=9), sham surgery (n=6) or i.t. PBS (n=6).

B: Normalized body weight in mice after primary non-pulmonary or pulmonary sepsis.

Post septic and post-control mice were subjected to secondary *P. aeruginosa* or *Klebsiella pneumoniae* i.t. instillation at day 7.

C: Survival after secondary i.t. administration of 10^6 CFU of *P. aeruginosa* (n=10 mice per group).

D: Survival after secondary i.t. administration of $5 \cdot 10^6$ CFU of *K. pneumoniae* (n=6 mice per group).

Supplementary figure 3:

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration). Cell distribution in the spleen was analyzed by flow cytometry.

A: Flow cytometry gating strategy used to identify myeloid subsets among splenocytes.

B: Time course of splenic cell distribution including spleen macrophage (spleen mac), Ly6C^{high} monocytes and PMN cells following the primary insult in post-CLP (black line), sham-operated (black dashed line), post-pneumonia (red line) and post-PBS mice (red dashed line) (n=4-10 mice per group and per time point).

Supplementary figure 4:

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration). Lung cell staining was carried out 24h after.

A: Expressions of 7-AAD and Annexin V in alveolar macrophages (n=5-10 in each group). Figures are representative of 2 independent experiments.

B: Monitoring of CX₃CR₁ MFI on AM surface using flow cytometry from each group at various time points after hit #1 (n=4-10 mice per groups at each time point). Figures are representative of 2 independent experiments.

C: MFI of CD115 on AM, Ly6C^{high} monocytes and Ly6C^{low} monocytes at day 7 after hit #1 assessed by flow cytometry (n=5-7, representative of two independent experiments).

Supplementary figure 5:

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration). Seven days after, alveolar macrophages were sorted by flow cytometry for transcriptomic analysis.

A: Significantly (FDR<25%, q-value≤0.001) dysregulated pathways using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) between alveolar macrophages from post-pneumonia, post-CLP and sham-operated mice compared to post-PBS alveolar macrophages. Pathways are classified according to their Normalized Enrichment Score (NES) value.

B: Principal component analysis (PCA) using the transcript abundance of all genes in alveolar macrophages (n=2-3 in each group).

C: Amounts of significantly up- or downregulated differentially expressed genes (DEG) in post-PBS, sham-operated and post-pneumonia alveolar macrophages compared to post-CLP alveolar macrophages (FC>2 and p-value<0.05).

D: Heatmaps representing the significantly dysregulated pathways (*p-value*) between post-PBS, sham-operated and post-pneumonia compared to post-CLP alveolar macrophages calculated using IPA (Ingenuity Pathways Analysis, QIAGEN*). N=3 mice per group.

Supplementary figure 6:

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration), and subjected to secondary *P. aeruginosa* i.t. instillation at day 7. 24h after *P. aeruginosa* i.t. challenge, alveolar macrophages were sorted by flow cytometry for transcriptomic analysis.

A: Gene Ontology (GO) enrichment of the differentially expressed genes (DEG) between post-CLP and post-PBS (upper table) and between post-pneumonia and post-PBS (lower table) alveolar macrophages. Biological processes with the significant adjusted p-values (<0.05) in DAVID system with the Benjamini-Hochberg correction for multiple testing from each group.

B: Heatmaps representing the significantly dysregulated pathways (*p-value*) between post-CLP, sham-operated and post-pneumonia compared to post-PBS alveolar macrophages calculated using IPA (Ingenuity Pathways Analysis, QIAGEN*). N=3 mice per group.

Supplementary figure 7:

Mice were subjected to a septic insult (CLP or i.t. *E. coli* challenge) or to a control procedure (sham surgery or i.t. PBS administration). Lung cell staining was carried out seven days after.

A: Flow cytometry gating strategy used for the identification of CD4⁺ T cells subsets in the lung.

B: CD4⁺ T cell counts (left panel) and proportions of effector memory T cells (CD45⁺ TcRβ⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD44⁺ CD62L⁻) among total CD4⁺ T cells (right panel). Results are representative of two independent experiments (n=7-9 mice per group).

C: Distribution of CD44⁺CD62L⁻ and CD44⁻CD62L⁺ subsets among lung Tregs. Results are representative of two independent experiments (n=7-9 mice per group).

D: Expressions of the transcription factors FoxP3, Tbet and RORγt in lung Tregs. Results are representative of two independent experiments (n=7-9 mice per group).

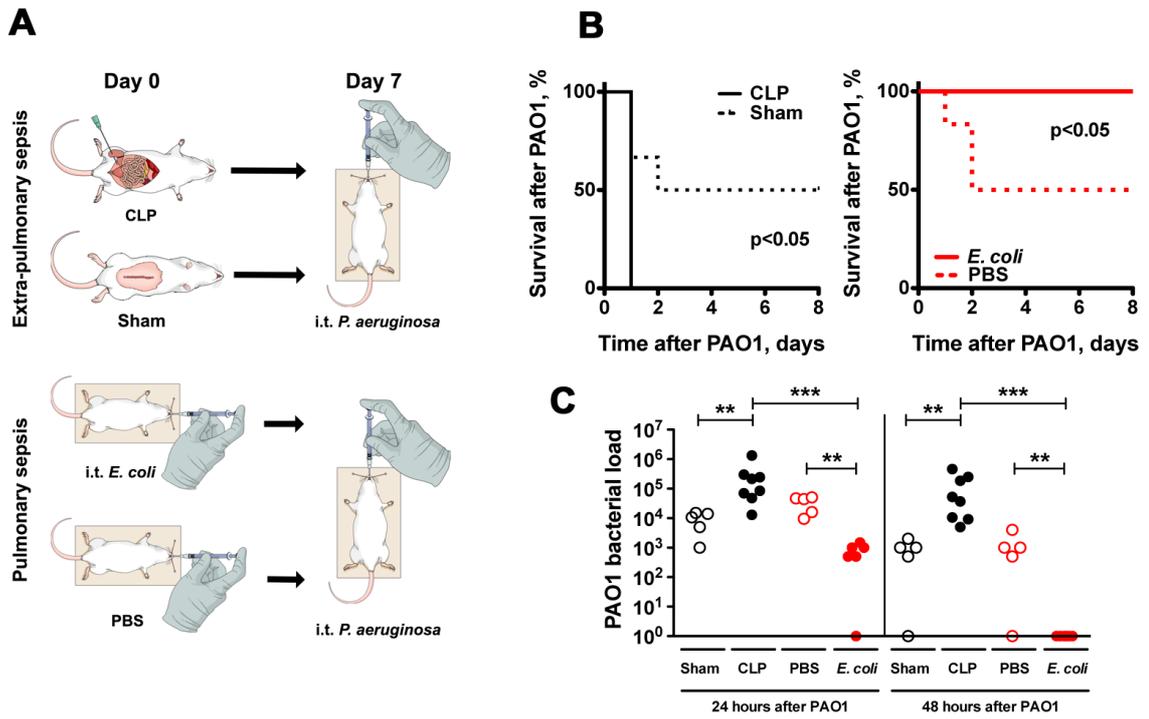


Figure 1: Characterization of the pulmonary and extra-pulmonary double-hit models

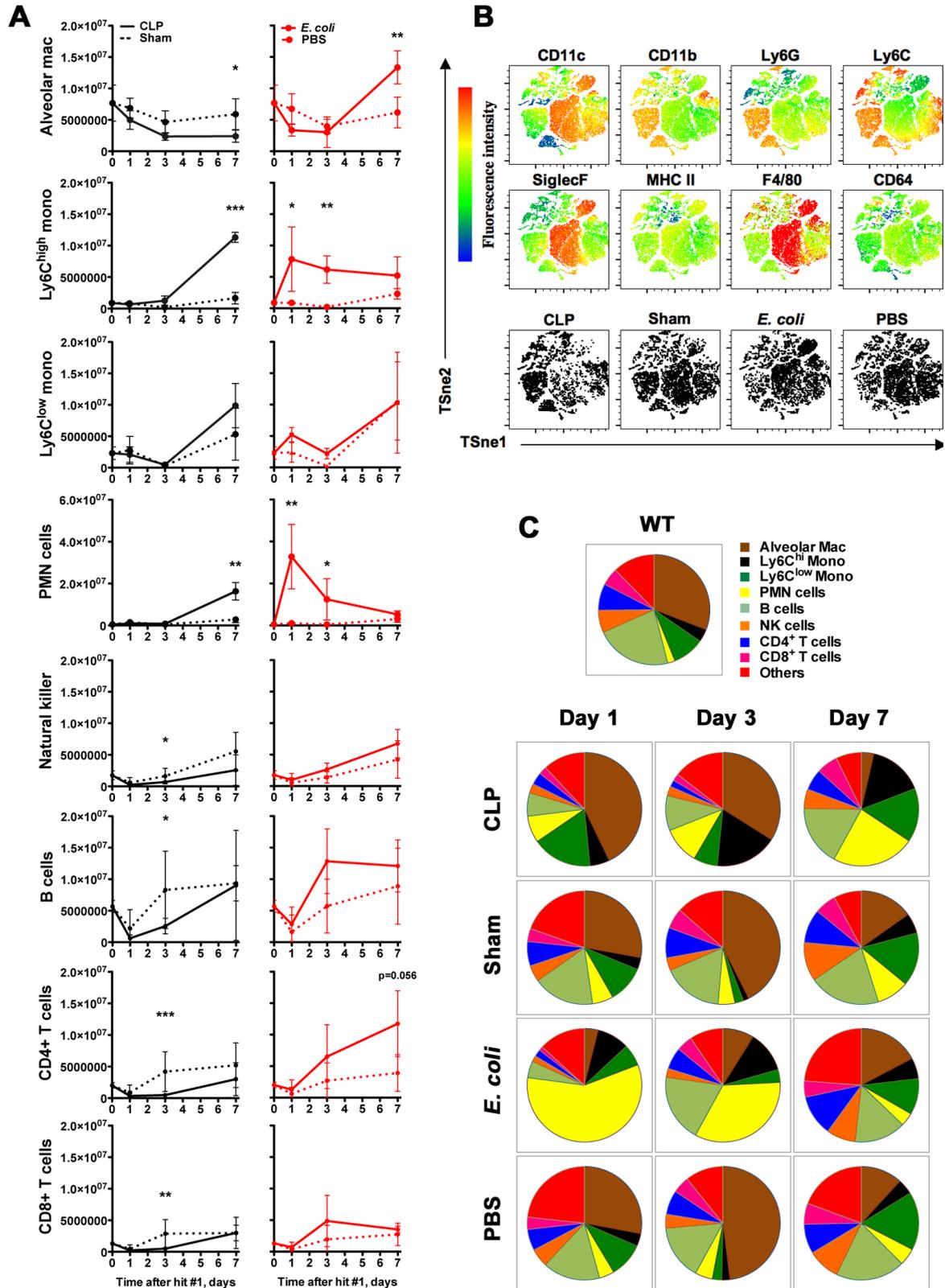


Figure 2: Distribution of immune cells in in lungs after primary non-pulmonary and pulmonary sepsis

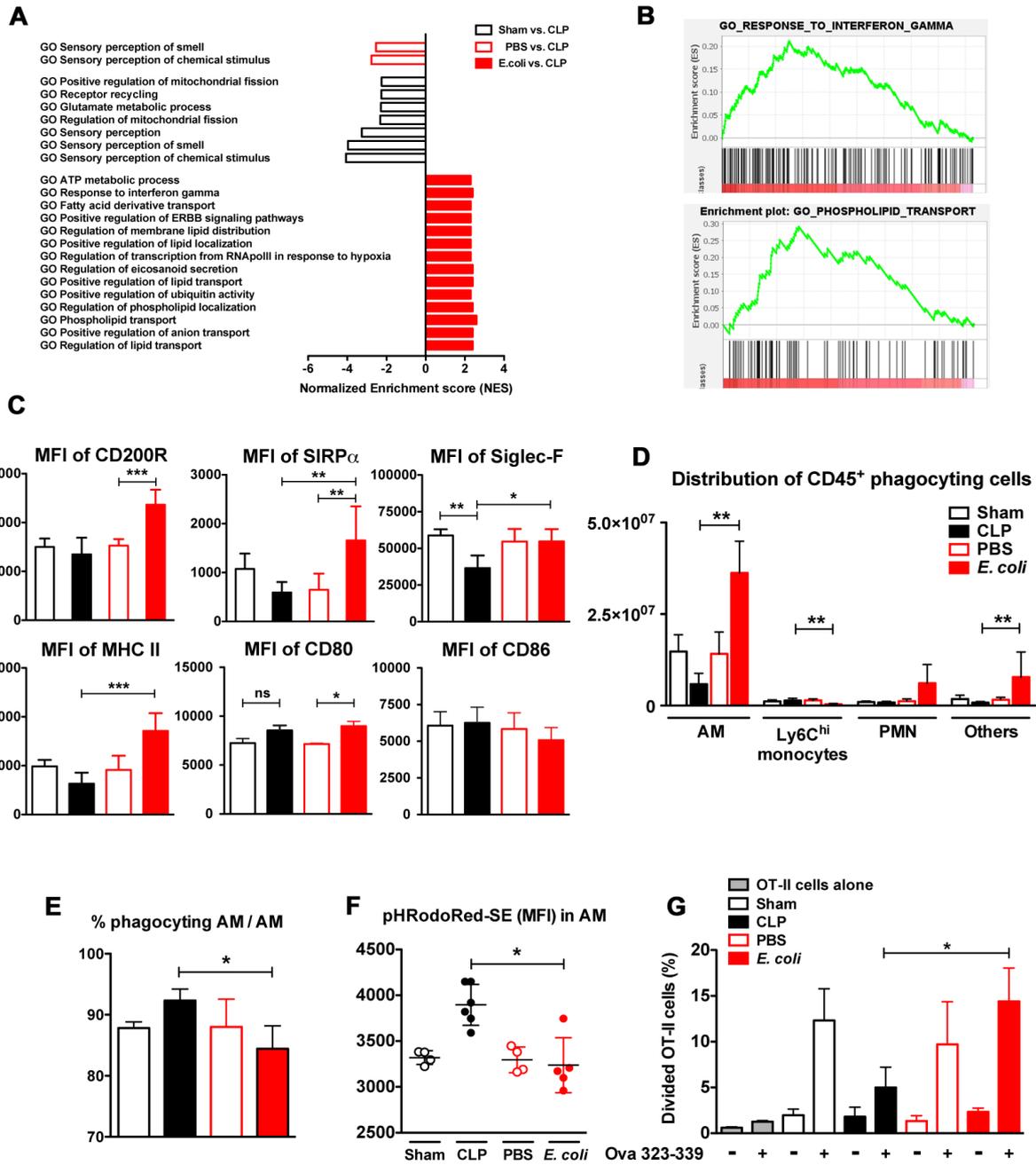


Figure 3: Non-pulmonary and pulmonary sepsis differentially modulate the phenotype of alveolar macrophages.

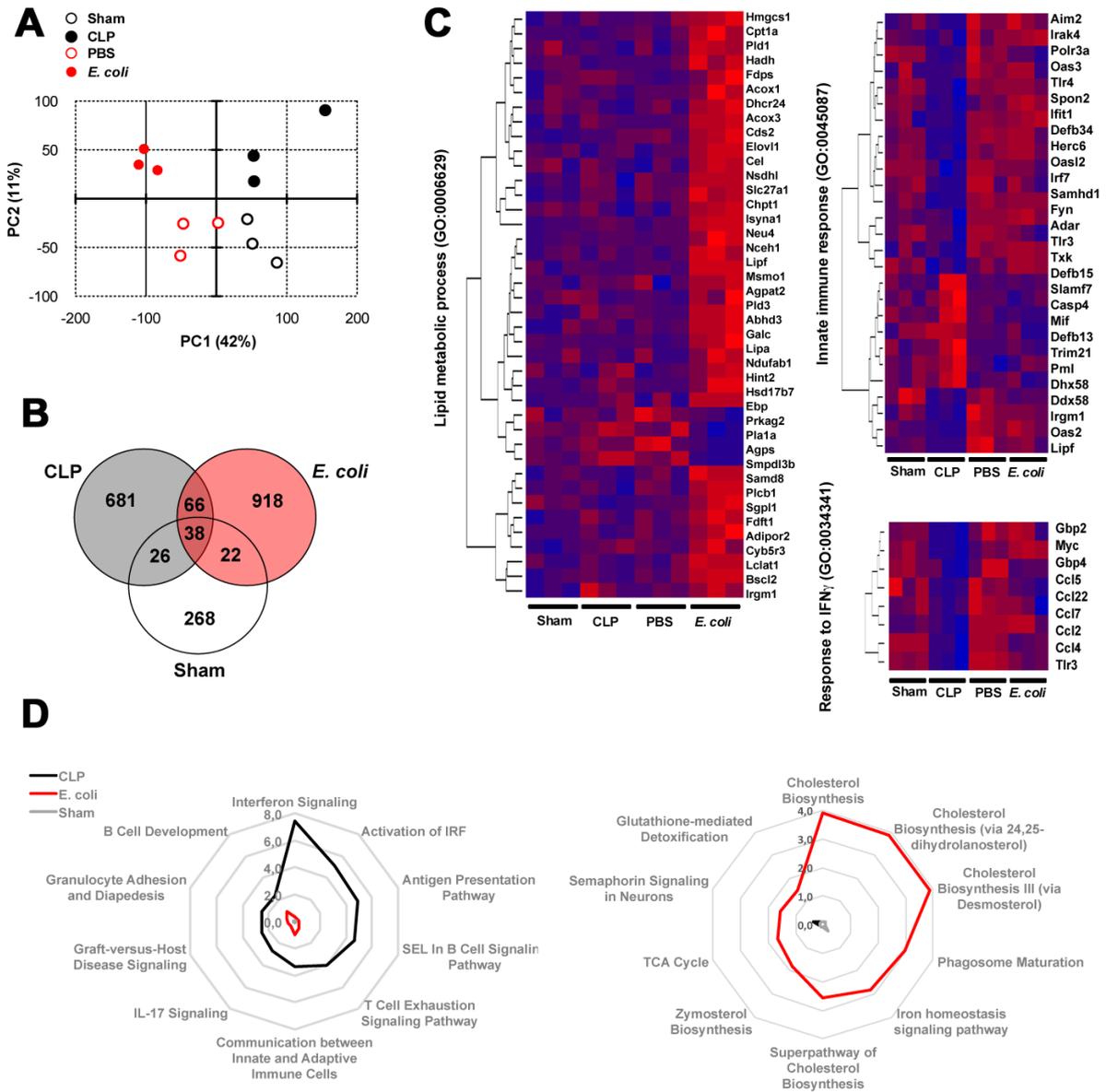


Figure 4: Transcriptomic analysis in alveolar macrophages during secondary *P. aeruginosa* pneumonia.

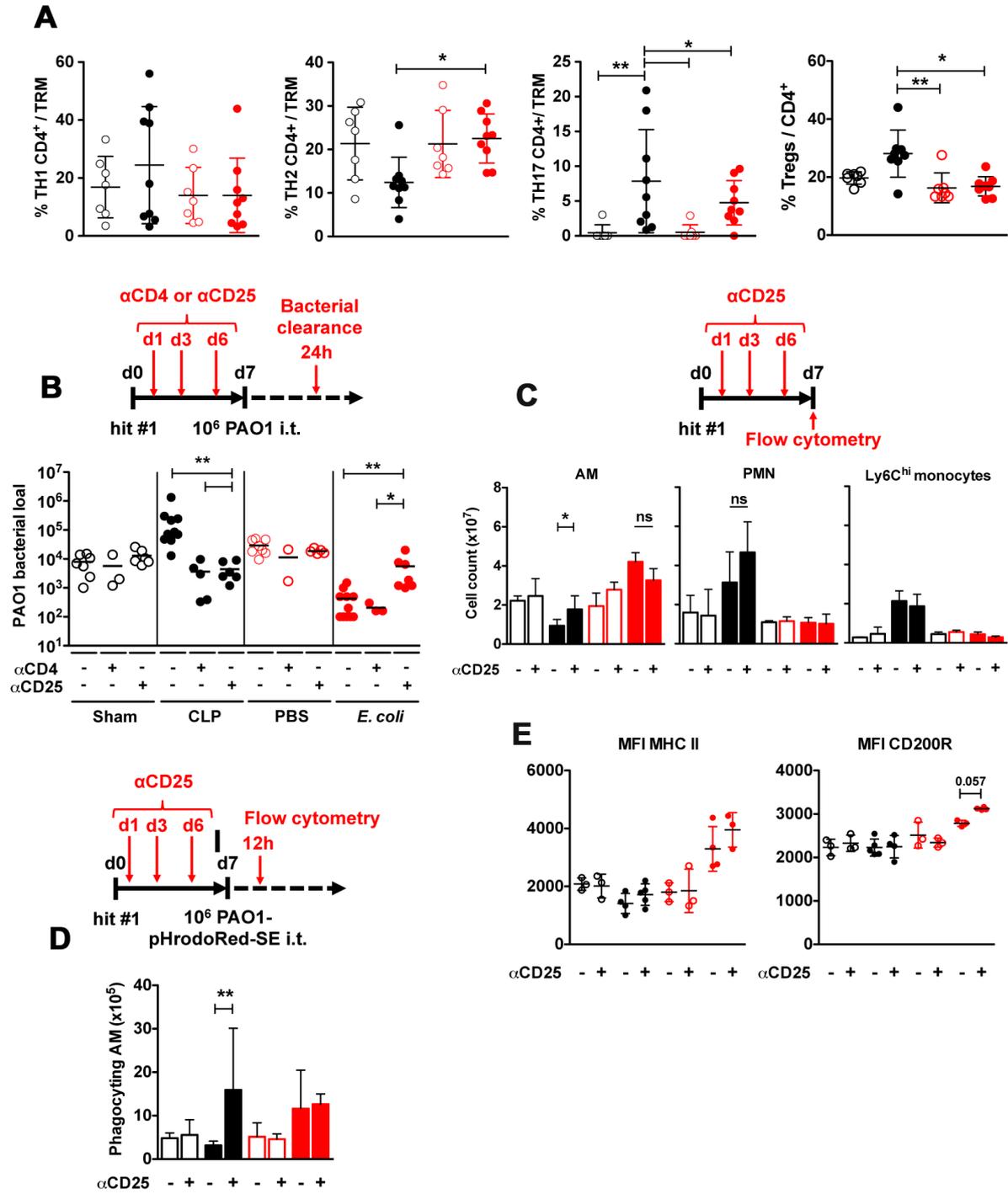


Figure 5: Remote polymicrobial sepsis increases the proportion of FoxP3⁺ Tregs in the lung

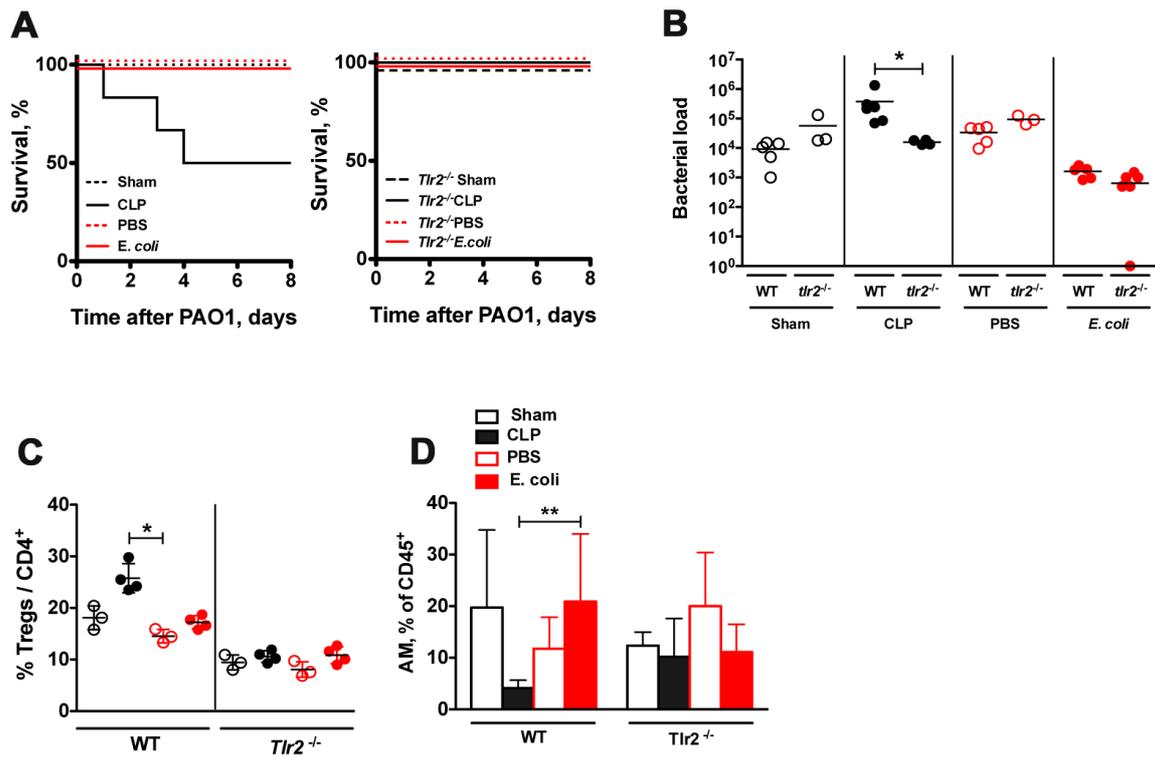
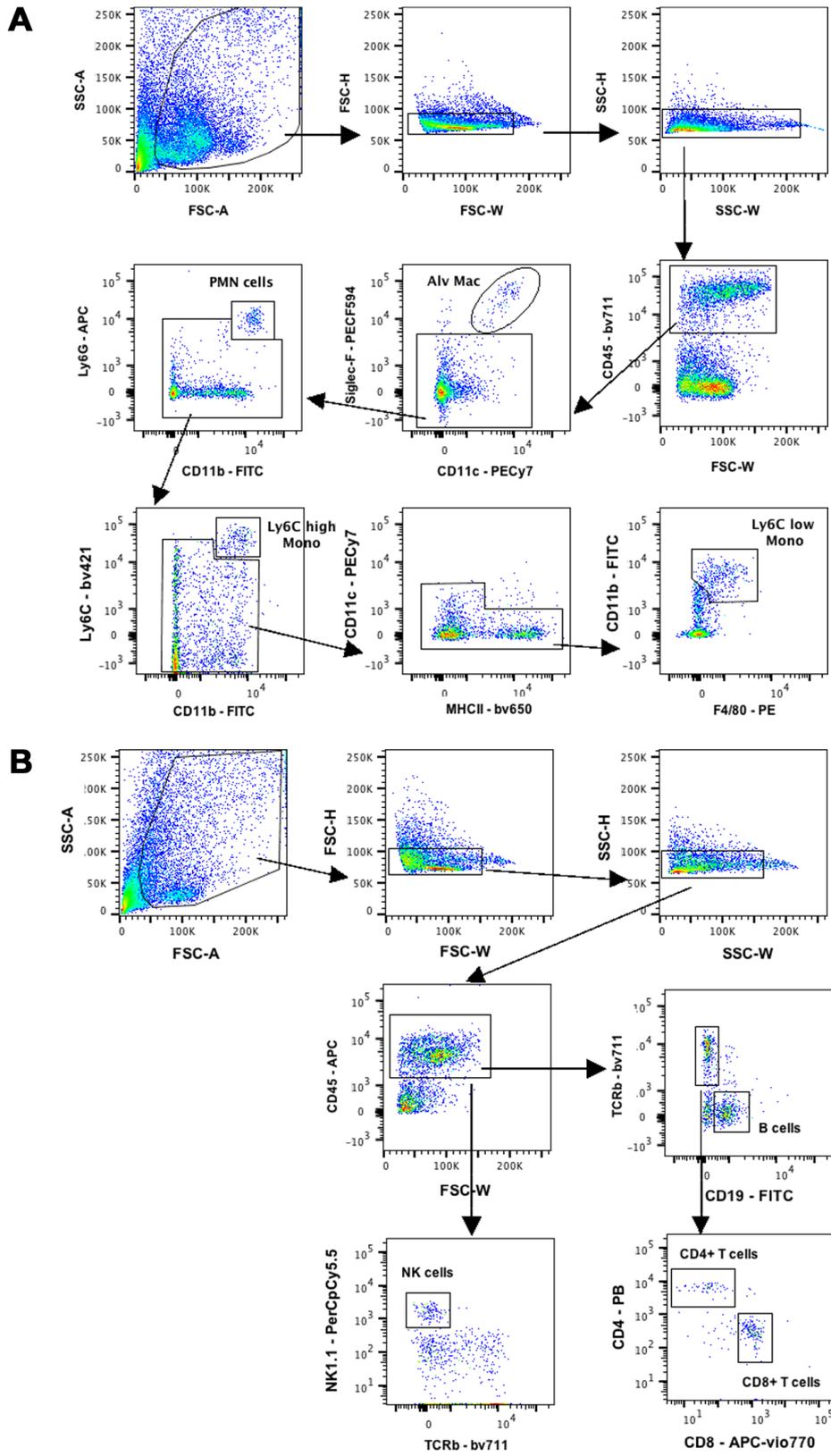
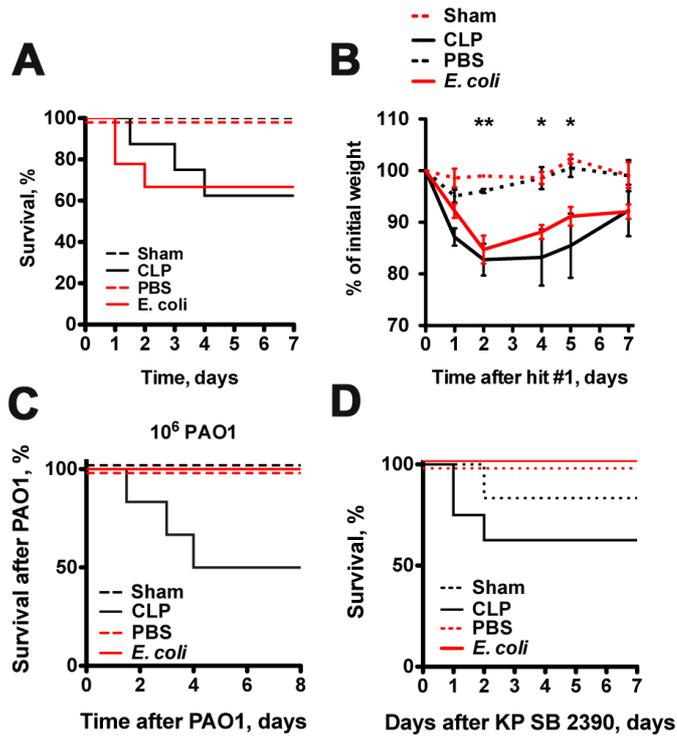


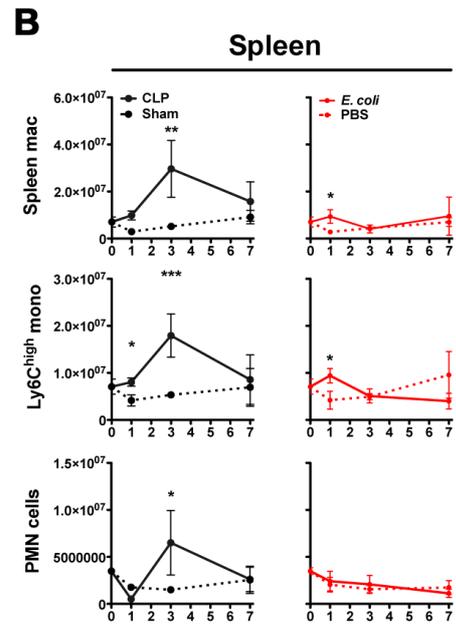
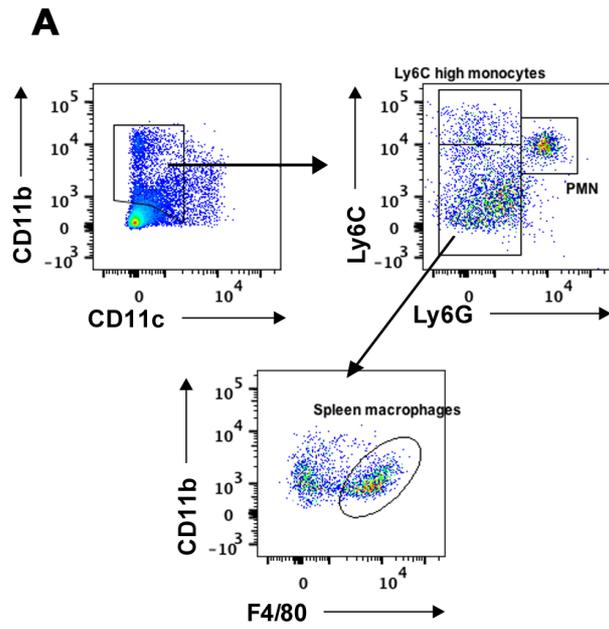
Figure 6: Tlr2 modulates the sepsis-related lung distribution in Tregs and alveolar macrophages



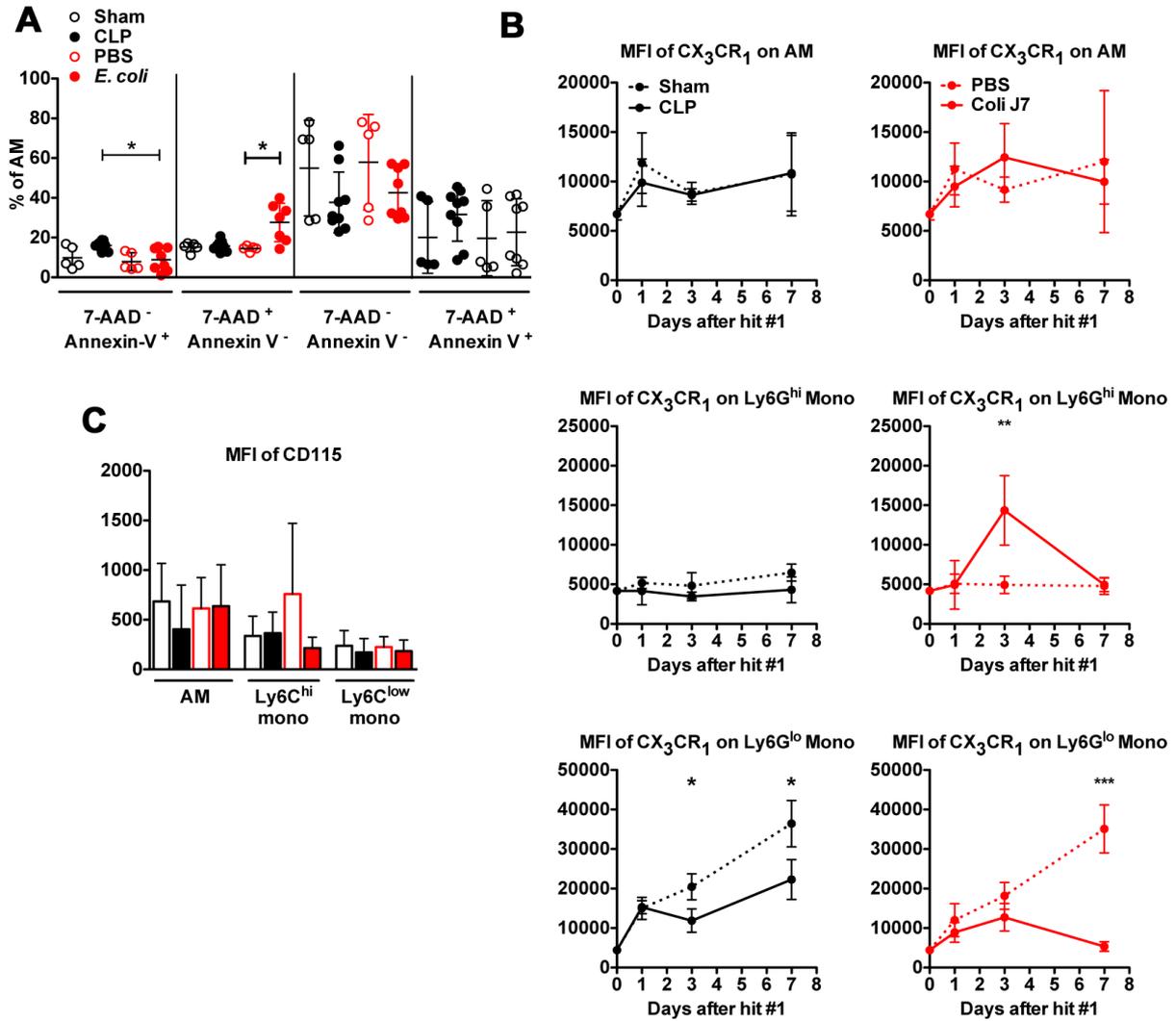
Supplementary figure 1



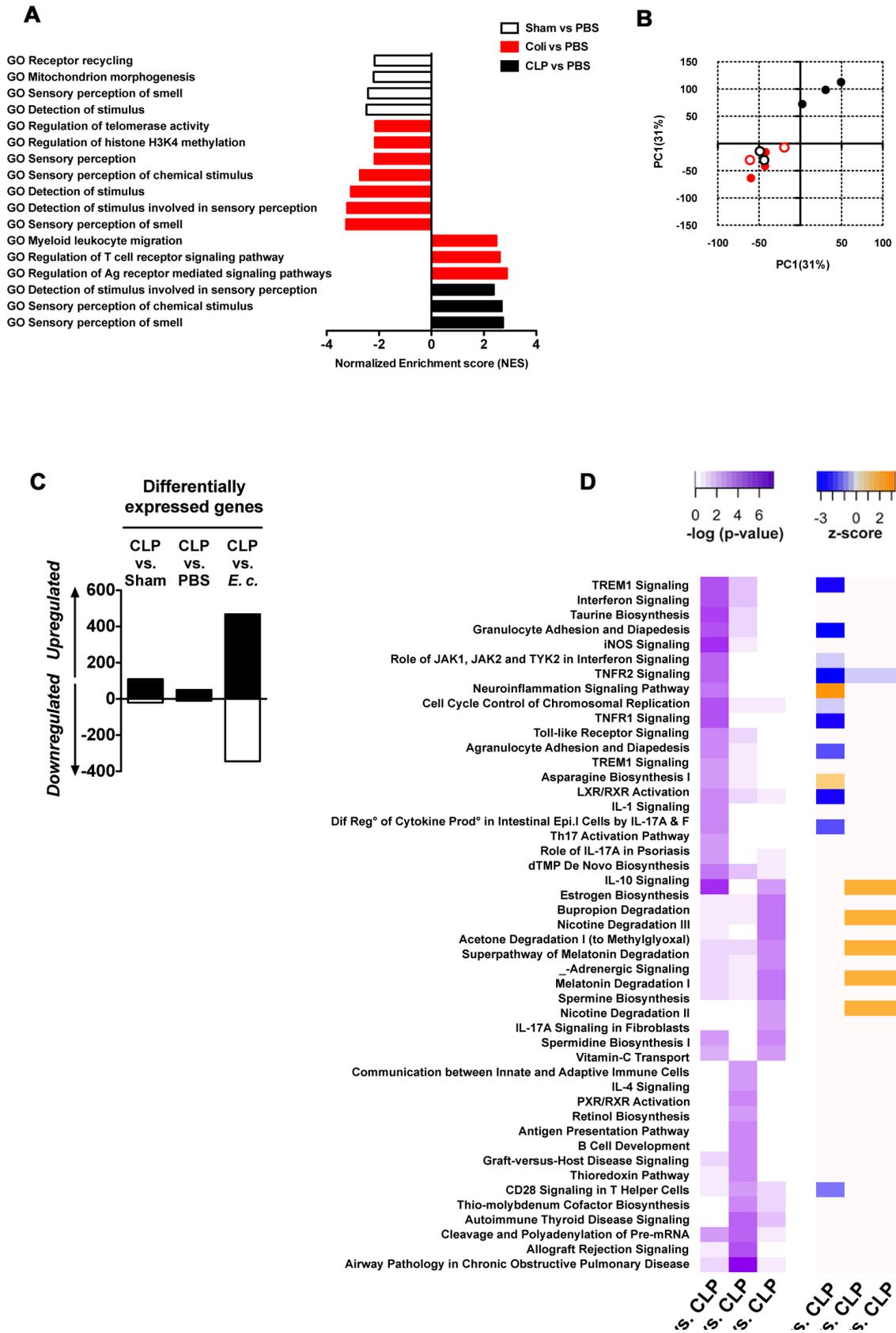
Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



Supplementary figure 4



Supplementary figure 5

A

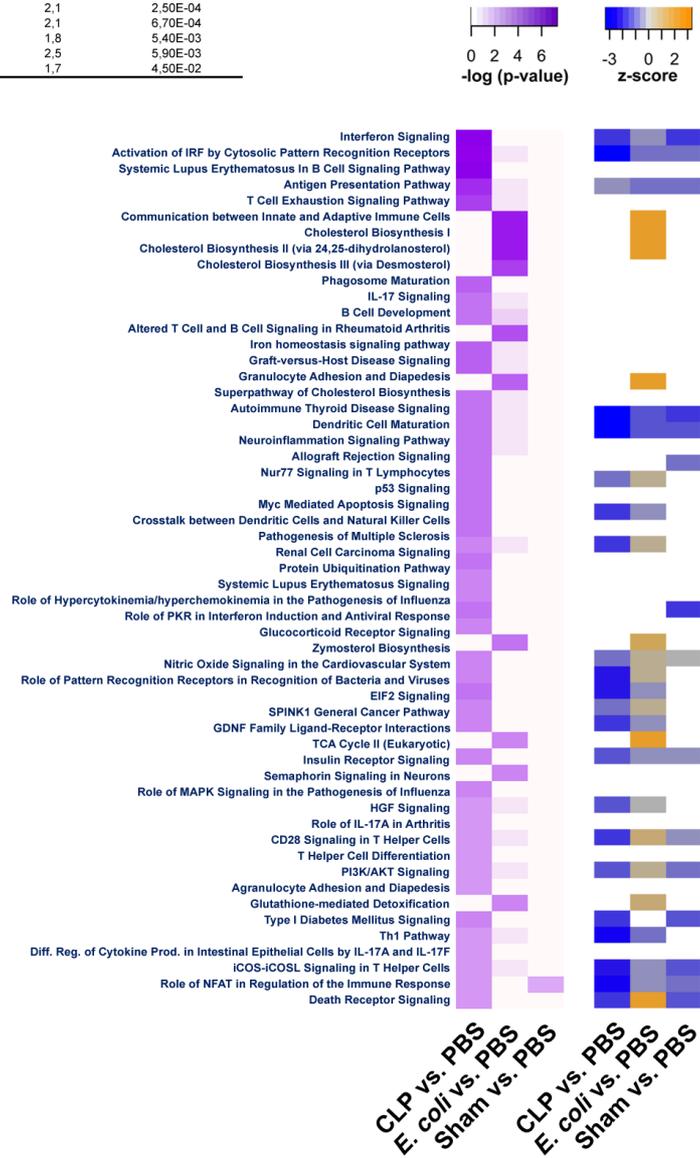
CLP versus PBS

Biological process gene ontology term (GO)	Genes	Enrichment score	Adjusted p-value
Defense response to virus	21	4,3	0,00014
Response to virus	15	6,2	0,00014
Innate immune response	31	2,7	0,0016
Positive regulation of tumor necrosis factor production	11	6,4	0,0035
Immune system process	29	2,6	0,0035
Chemokine-mediated signaling pathway	10	6,3	0,01
Chemotaxis	14	4,1	0,013
Ribosome biogenesis	12	4,7	0,015
Cellular response to drug	11	5,1	0,015
Cellular response to interferon-beta	8	6,7	0,037
mRNA processing	23	2,5	0,039
RNA splicing	19	2,7	0,047

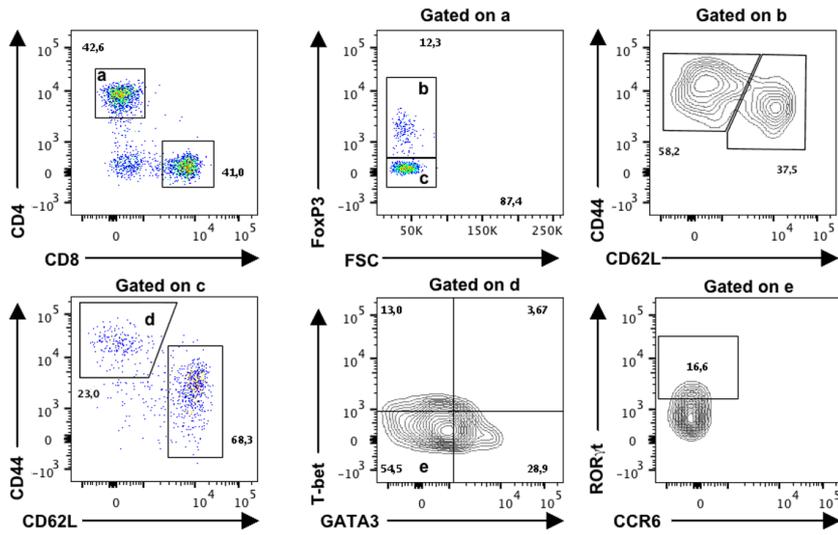
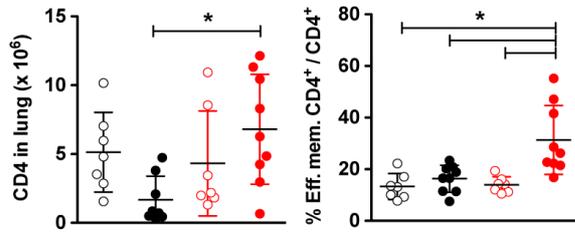
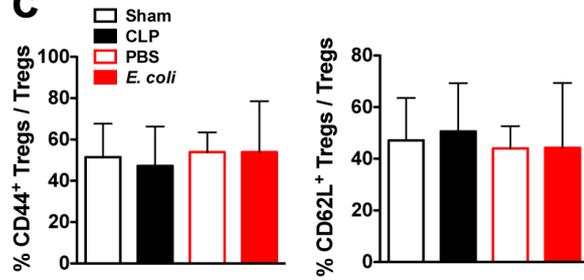
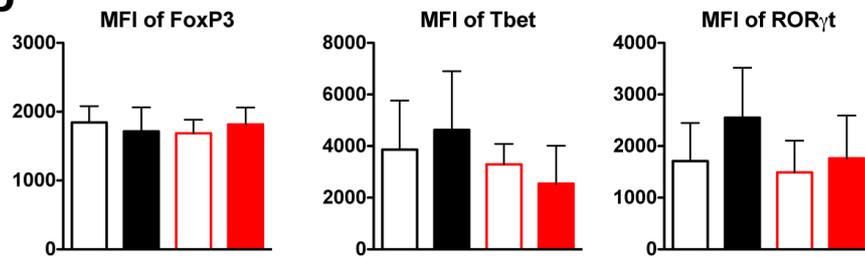
E. coli versus PBS

Biological process gene ontology term (GO)	Genes	Enrichment score	Adjusted p-value
Transport	159	1,5	2,50E-04
Metabolic process	57	2,1	2,50E-04
Lipid metabolic process	55	2,1	6,70E-04
Oxidation-reduction process	69	1,8	5,40E-03
Carbohydrate metabolic process	30	2,5	5,90E-03
Apoptotic process	57	1,7	4,50E-02

B



Supplementary figure 6

A**B****C****D**

Supplementary figure 7

IV. Article 4: Assessing the functional heterogeneity of monocytes in human septic shock: a proof-of-concept microfluidic assay of TNF α secretion

Jean-François Llitjos, Yacine Bounab, Christophe Rousseau, Sophie Dixneuf, Blandine Rimbault, Jean-Daniel Chiche, Julien Textoris, Frédéric Pène, Christophe Vedrine.

Soumis pour publication (reviewing dans Frontiers in Immunology)

Si l'accès aux macrophages tissulaire demeure exceptionnel en clinique, l'évaluation des fonctions des monocytes circulants est maintenant de pratique courante. La désactivation persistante des monocytes circulants dans les suites d'un choc septique a été associée à un risque accru d'infections nosocomiales. Cette désactivation monocyttaire est caractérisée par une réduction d'expression membranaire de HLA-DR et par une diminution de la capacité de sécrétion de TNF α après stimulation *ex vivo* au LPS. Le statut immunologique des patients est apprécié par un comportement global de cette population cellulaire, mais qui n'est que la sommation de comportements cellulaires individuels. Ce raccourci est s'applique lors des tentatives de restauration fonctionnelle des monocytes par des thérapeutiques telles que l'IFN γ ou le GM-CSF. En d'autres termes l'hétérogénéité intercellulaire et chronologique des dysfonctions immunitaires n'est pas prise en compte dans ces phénomènes. Des techniques expérimentales innovantes basées sur l'encapsulation de cellules dans des gouttelettes lipidiques dans un système de microfluidique permettent maintenant d'appréhender le comportement fonctionnel individuel de cellules au cours du temps.

Cette technique a permis d'évaluer en temps réel la sécrétion individuelle de TNF α par des monocytes de patients septiques (n=7) et de volontaires sains (n=10) exposés à une stimulation par LPS. Cette méthode est basée sur le suivi temporel de la fluorescence d'un anticorps dirigé contre le TNF α pour une cellule individuelle introduite et maintenue dans une gouttelette via un système de microfluidique. Ces résultats ont été confrontés à ceux obtenus par cytométrie de flux (expressions membranaire de HLA-DR et intracellulaire de TNF α). Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'existence d'une variabilité temporelle importante et d'une grande hétérogénéité des réponses monocytaires chez les patients septiques.

Title: Assessing the functional heterogeneity of monocytes in human septic shock: a proof-of-concept microfluidic assay of TNF α secretion

Short running title: heterogeneity of monocytes in septic shock

Authors

Jean-François Llitjos, MD, MSc ^{1,2,3}, Yacine Bounab, PhD ⁴, Christophe Rousseau ^{1,2}, Sophie Dixneuf, PhD ⁴, Blandine Rimbault, PhD ⁴, Jean –Daniel Chiche^{1,2,3}, Julien Textoris, MD, PhD ^{5,6,7}, Frédéric Pène, MD, PhD ^{1,2,3}, Christophe Vedrine, PhD ⁴.

Affiliations

1. Institut Cochin, U1016, CNRS UMR8104, Paris, France
2. Université de Paris, Paris, France
3. Médecine intensive et réanimation, Cochin Hospital, Paris, France
4. BIOASTER, Lyon, France
- 5 EA7426 “Pathophysiology of Injury-induced immunosuppression”, Université Claude Bernard Lyon-1 - HCL- bioMérieux, Lyon, France.
- 6 Medical Diagnostic Discovery Department (MD3), bioMérieux S.A., France.
- 7 Anesthesiology and Critical Care Medicine, HCL, Lyon, France.

Corresponding author:

Vedrine Christophe, PhD. BIOASTER, Lyon, France. Correspondence to christophe.vedrine@bioaster.org

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the healthy donors and the septic patients who volunteered to donate peripheral blood for these experiments.

We would like to thank Marie-Noelle Unheheuer, Hélène Laude and Blanca Liliana Perlaza for access to BioResources platform (ICAReB).

The age and health status of healthy donors and their blood were provided by the Investigation Clinique et Acces aux Ressources Biologiques (ICAReB) platform (Dr

Marie-Noelle Ungeheuer, Centre de Recherche Translationnelle, Institut Pasteur, Paris, France) as part of the DIAGMICOLL or CoSIImmGEn (N° CORC: 2008-16 and 201-06) protocol, which has been approved by the French Ethical Committee (CPP), Ile-de-France.

Samples from septic shock patients were obtained from the prospective cohort MICROFLU-SEPSIS which has been approved by the French Ethical Committee CPP Sud Ouest et Outre Mer 4 (registration number 2017-A01134-49). Patients were included in the medical intensive care unit of Cochin hospital and informed consent was obtained from all the participants or their legally authorized representatives.

We thank Virginie Moucadel for critical reading of the manuscript.

The project was funded by a consortium: bioMérieux, SANOFI, GlaxoSmithKline, Ecole Supérieure de Physique Chimie Industrielles de la Vilette Paris–PSL Research University, the University Hospital Hospices Civils de Lyon and the microbiology technological institute BIOASTER. This research project has received funding from the French Government through the “Investissement d’Avenir” program (grant n°ANR-10-AIRT-03).

Collaborators of the REALISM Study Group: For Hospices Civils de Lyon: André Boibieux, Julien Davidson, Laure Fayolle-Pivot, Julie Gatel, Charline Genin, Arnaud Gregoire, Alain Lepape, Anne-Claire Lukaszewicz, Guillaume Marcotte, Marie Matray, Delphine Maucort-Boulch, Guillaume Monneret, Nathalie Panel, Thomas Rimmele, Hélène Vallin, Fabienne Venet. For bioMérieux: Sophie Blein, Karen Brengel-Pesce, Elisabeth Cerrato, Valérie Cheynet, Emmanuelle Gallet-Gorius, Audrey Guichard, Camille Jourdan, Natacha Koenig, François Mallet, Boris Meunier, Virginie Moucadel, Marine Mommert, Guy Oriol, Alexandre Pachot, Claire Schrevel, Olivier Tabone, Julien Textoris, Javier Yugueros Marcos. For BIOASTER: Jérémie Becker, Frédéric Bequet, Yacine Bounab, Florian Brajon, Bertrand Canard, Muriel Collus, Nathalie Garcon, Irène Gorse, Cyril Guyard, Fabien Lavocat, Philippe Leissner, Karen Louis, Maxime Mistretta, Jeanne Moriniere, Yoann Mouscaz, Laura Noailles, Magali Perret, Frédéric Reynier, Cindy Riffaud, Mary-Luz Rol, Nicolas Sapay, Trang Tran, Christophe Vadrine. For Sanofi: Christophe Carre, Pierre Cortez, Aymeric De Monfort, Karine Florin, Laurent Fraisse, Isabelle Fugier, Maïna L’Azou, Sandrine Payrard, Annick Peleraux, Laurence Quemeneur. For ESPCI Paris: Andrew

Griffiths, Stephanie Toetsch. For GSK: Teri Ashton, Peter J. Gough, Scott B. Berger, David Gardiner, Iain Gillespie, Aidan Macna-mara, Aparna Raychaudhuri, Rob Smylie, Lionel Tan, Craig Tipple. Collaborators of the MIPrea Study Group: Christine Alberti-Segui, Bernard Allaouchiche, Laurent Argaud, Frédéric Aubrun, Véronique Barbalat, Thomas Baudry, Julien Bohé, Marie-Angélique Cazalis, Elisabeth Cerrato, Martin Cour, Sylvie De La Salle, Benjamin Delwarde, Bernard Floccard, Arnaud Friggeri, Emmanuelle Gallet-Gorius, Christian Guillaume, Romain Hernu, Audrey Larue-Triolet, Alain Lepape, Guillaume Marcotte, Delphine Maucort-Boulch, Boris Meunier, Guillaume Monneret, Stéphane Morisset, Julie Mouillaux, Alexandre Pachot, Mathieu Page, Nathalie Panel, Estelle Peronnet, Vincent Piriou, Anne Portier, Marion Provent, Thomas Rimmelé, Marie Simon, Julien Textoris, Fabrice Thiollere, Hélène Vallin, Fabienne Venet.

Word count : 1630 words

Abstract (200 words):

Objective: The development of advanced single-cell technologies to decipher inter-cellular heterogeneity enable the dynamic assessment of individual cells behavior over time, overcoming the limitation of traditional assays. Here, we evaluated the feasibility of an advanced microfluidic assay combined to fluorescence microscopy to address the behavior of circulating monocytes from septic shock patients.

Methods: Using the proposed microfluidic assay we first investigated the production course of LPS-elicited TNF α by single monocytes (encapsulated within droplets) over time in seven septic shock patients and ten healthy volunteers. Simultaneously, we validated the relevance of our results by comparing with flow cytometry assessment of HLA-DR expression and LPS-induced TNF α production by monocytes from the same cohorts of patients.

Results: Consistent with the flow cytometry results, the total number of TNF α molecules secreted by encapsulated single monocytes was significantly lower in septic shock patients compared to healthy donors. However, the microfluidic assay revealed heterogeneous individual behavior of monocytes from septic shock patients: TNF α production was dampened at early time points of either 30 minutes or 60

minutes after LPS stimulation. Noteworthy, monocytes from healthy donors and from septic patients exhibited similar phagocytic activities over time.

Conclusion: This microfluidic assay may well represent a useful tool to understand the mechanisms of post septic immunosuppression.

Keywords: septic shock, immune suppression, monocytes deactivation, microfluidic assay

INTRODUCTION

Sepsis is a complex life-threatening syndrome caused by a dysregulated host response to infection (1). The primary inflammatory response is often followed by a complex and sustained immunosuppressive response affecting both the innate and adaptive components of immunity. The hallmark features of sepsis-induced immunosuppression includes monocyte deactivation defined by reduced expression of HLA-DR, dampened pro-inflammatory cytokine production towards *ex vivo* lipopolysaccharide (LPS) stimulation, lymphocyte apoptosis, expansion of regulatory T-cells, apoptosis and defective antigen presentation of dendritic cells (2,3). Septic shock is the most severe presentation and is associated with a particular risk of ICU-acquired infections and an eventual 40-percent mortality rate. The persistence of monocyte deactivation in septic patients has been firmly associated with an increased susceptibility to ICU-acquired infections and may represent an actionable therapeutic target in this setting (4).

Appropriate characterization of sepsis-induced immune dysfunctions is key to the development of innovative therapeutic strategies. Routine assays provide average measurements of cell subsets but are poorly discriminant since unable to capture the behavior of individual cells. For instance, ELISA measuring of TNF- α release by PBMC (peripheral blood mononuclear cells) after *ex vivo* LPS stimulation is a bulk measurement that overlooks the underlying complexity of different cell types. The development of advanced technologies such as RNA-sequencing or high-parameter mass cytometry now provides insights in deciphering inter-cellular heterogeneity at a single-cell resolution but shows limitations in addressing dynamic assessments in individual cells over time (5,6). Furthermore Enzyme-linked immunospot (ELISPOT), commonly used to detect proteins secreted from individual cells, is limited to endpoint measurements and is poorly quantitative. We developed an advanced microfluidic assay combined to fluorescence microscopy to address the time course of LPS-elicited TNF α production by single monocytes encapsulated within droplets. We have developed an ultrasensitive in-droplet immunoassay (7). Briefly this sandwich assay is based on fluorescence signal relocation to paramagnetic nanoparticles. Nanoparticles are functionalized with a TNF- α capture antibody and

analyte is recognized by a TNF- α Phycoerythrin-conjugated detection antibody. Thousands of single in-droplet cells are monitored in parallel. This miniaturized assay enables simultaneous measurements of protein secretion rate, cell surface marker, viability and phagocytic activity. In order to better characterize monocyte deactivation in sepsis, we applied this technique to blood samples from septic shock patients and healthy volunteers as controls.

METHODS

Sample origin for study population

The study was conducted from October 2018 to November 2019 in a medical ICU of a tertiary urban hospital. The condition of interest was septic shock, defined as microbiologically-proven or clinically-suspected infection associated with acute circulatory failure requiring vasopressors despite adequate fluid filling and serum lactate level ≥ 2 mmol/L. Patients were excluded if under 18 years of age, pregnancy, prior immunosuppression, leucopenia < 1 G/L, hospitalization during the last month or decision of treatment withdrawal. Blood samples (7 mL on heparin-coated vial and 7 mL on EDTA-coated vial) were collected within 72 hours from the onset of vasopressors. The following parameters were collected: demographics, source and microbiological documentation of infection, severity as assessed by the Simplified Acute Physiology Score 2 (SAPS2; range 0–194) and the Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA; range 0–24). Blood samples from healthy volunteers were obtained from the ICAReB platform (Investigation Clinique et Accès aux Ressources Biologiques, Pasteur Institute, Paris). The study was approved by the appropriate institutional review board (Comité de Protection des Personnes du Sud-Ouest et Outre-Mer IV). Signed informed consent forms were collected from patients or next of kin. According to ICAReB standardized procedures for blood donation, informed consent was obtained from healthy donors and personal data were anonymized at the time of blood donation and before the transfer of blood to the research lab. Therefore, informed consent was collected for all participants. All experiments were performed in accordance with French ethical guidelines and regulations.

Flow cytometry

Membrane expression of HLA-DR onto monocytes and LPS-induced intracellular expression of TNF α were assessed by flow cytometry. Fluorescent antibodies anti-HLA-DR PE, Anti-CD14 PerCP-Cy5.5 and anti-TNF α PE were purchased from QuantiBRITE, Becton-Dickinson. Briefly, 25 μ l of whole blood was mixed with 10 μ l of antibody mix (anti-HLA-DR PE, Anti-CD14 PerCP-Cy5.5) and incubated at room

temperature for 30 minutes in the dark. Red blood cells were lysed by adding 250 μ l of diluted FACS lysing solution (Becton-Dickinson). The pellet was resuspended in 500 μ l of fixative solution (PBS supplemented with PFA 1%). Acquisition was immediately carried out on Accuri C6 cytometer. For intra-cellular TNF α staining, 1 mL of whole blood was mixed with 5 μ g/mL Brefeldin A (Biolegend) with or without 1 μ g LPS (LPS ultrapure EK12, InVivoGen) and incubated at 37°C for three hours. Cells were stained with anti-TNF α antibody in phosphate-buffered solution supplemented with 2% fetal calf serum, 2 mM EDTA and BD fix/perm solution (Becton-Dickinson). Monocytes were first gated on CD14 expression, to reach a count of at least 1500 CD14⁺ cells. Surface mHLA-DR expression was then measured (monoparametric histogram) with mean fluorescence intensity (MFI) related to the whole monocyte population.

Single monocyte encapsulation by droplet microfluidics

Cell and reagents were prepared and encapsulated as previously described (7). Briefly, monocytes from healthy donors or septic shock patients were enriched with an EasySep Direct Human Monocyte Isolation Kit (STEMCELL Technology) and encapsulated into 50 pL droplets (one monocyte per droplet) together with anti-TNF α coated-nanobeads, phycoerythrin-labeled anti-TNF α detection antibody, LPS and cell survival probes (MitoView for detecting mitochondrial membrane potential and NucView for measuring caspase-3 activity). The resulting emulsion was transferred into a microfluidic imaging chamber. After filling, the chamber was mounted onto a fluorescence microscope for real-time kinetic measurement.

Automated image analysis and processing

Imaging was performed using a motorized Nikon inverted microscope and x10 magnification. For each experiment, images were acquired in three fluorescence channels (Excitation/Emission: 482/520 nm, 531/593 nm, 628/692 nm) every 30 min over 3 hours at the temperature of 37°C, and then analyzed using an automated Matlab script for extracting time lapse fluorescence levels, and with a R software for statistical analysis.

Phagocytosis monitoring

Magnetic nanoparticles can bind to the cell surface and be internalized through cellular endocytic activity. Our platform has the capacity to track monocytes that internalize nanoparticles. Briefly, the location of the cell relative to the location of the beadline (aligned magnetic functionalized nanobeads) was used to assess an effective endocytosis of the beadline by the cell.

Statistics

Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation and compared using Student's t-test. $p < 0.05$ indicated statistically significant differences.

RESULTS

Patients and control subjects

Seven septic shock patients and 10 healthy donors were enrolled in the study. Individual data are given in **Table 1**.

Flow cytometry assessment of monocyte deactivation

The hallmark features of monocyte deactivation, namely decreased HLA-DR membrane expression and impaired TNF α production in response to LPS stimulation, were assessed for circulating monocytes from septic shock patients and compared to those from healthy donors. TNF α -secreting cells accounted for $7.5 \pm 6\%$ and $63 \pm 14.1\%$ of monocytes in patients and healthy donors, respectively (**Figure 1A and 1D**). In addition the MFI for intracellular TNF α expression was significantly lower in septic shock patients versus healthy donors (979 ± 684 vs 3661 ± 1084 , $p < 0.001$) (**Figure 1B**). HLA-DR surface expression was significantly lower in septic patients versus healthy donors (MFI 59530 ± 23110 vs. 124300 ± 19050 , $p < 0.001$) (**Figure 1C**).

Single-cell dynamic microfluidic analysis

The microfluidic dynamic assay (**Supplementary figure 1**) allows a continuous measurement over time of molecules that are secreted by single cells (**Figure 2A and 2B**). Consistent with the flow cytometry results, the total number of secreted TNF α molecules by encapsulated single cells was significantly lower in septic shock patients compared to healthy donors (3390 ± 2071 vs. 5807 ± 2309 molecules, $p = 0.04$) (**Figure 2C**). The time to reach total TNF α release was not significantly different between healthy donors and septic shock patients (**Figure 2D**). However, TNF α production by monocytes from septic shock patients was lower through the decreased proportion of secreting monocytes at early time points of 30 minutes and 60 minutes after LPS stimulation (**Figure 2E**). Of note, the monocytes from healthy donors and from septic patients exhibited similar phagocytic activities over time (**Figure 3**).

The microfluidic assay revealed heterogeneous individual behavior of monocytes. Thus monocytes from healthy donors displayed TNF α secretion rates ranging from 0.5 to >2.5 molecules/sec (**Figure 2F**). In septic shock patients the proportion of cells with secretion rate > 1.5 molecule/sec was decreased at early time points (30 min and 60 min) (**Figure 2G**). Furthermore, the septic shock condition likely smoothed the heterogeneity in TNF α secretion rate by monocytes, as suggested by the increased proportions of cells displaying slow TNF α secreting rates at each time point.

DISCUSSION

The characterization of monocytes in humans is based on summed measurements within one cell subset, assuming that individual cells harbor similar functional behavior, but without any assessment in reaction speed nor in sustainability of cell responses. Thanks to an advanced microfluidic assay, we can now challenge this global view by evidencing the dynamic functional heterogeneity of monocytes. This study revealed different patterns of cytokine responsiveness across circulating monocytes from healthy subjects. Monocytes from septic shock patients were characterized by a slowdown in TNF α secretion and a lower diversity restricted to slow TNF α -secreting cells. In contrast, it is noteworthy that their phagocytic capacities were preserved. This exploratory study limited to a small sample size precluded any firm correlation between TNF α secretion profile and clinical outcomes.

Monocytes represent a heterogeneous population of cells differing in morphology, gene expression, surface markers and functions (8). Based on the membrane surface expression of CD14 and CD16, monocytes are classically distributed into three subsets of different functions. The classical CD14⁺⁺⁺ CD16⁻ monocytes account up to 80% of circulating monocytes and harbor potent phagocytic functions. Intermediate CD14⁺CD16⁺ monocytes display both phagocytic and cytokine secretion functions and increase under inflammatory conditions. Non-classical CD14⁺CD16⁺⁺⁺ monocytes have a patrolling role (9). An infectious insult can induce an early and transient monocytopenia in all three subsets (10), ascribed to increased adherence to vessel walls and cell recruitment to inflammatory sites, and restored by monocytes release from bone marrow (11).

The decrease in TNF α secretion rate in septic patients was mostly observed at early time points following LPS stimulation. Monocytes from septic shock exhibited a characteristic behavior of cytokine hyporesponsiveness while preserved uptake functions, consistent with a “reprogrammed” rather than “exhausted” phenotype. 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 (12). The transcription factor hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) has been involved in the transition from pro-inflammatory to anti-inflammatory monocytes/macrophages (13). Identifying the specific monocyte subsets responsible for this phenomenon was limited by the absence of CD16 staining in our study. Finally, whether these findings drawn from circulating monocytes may apply to their tissue counterparts remain elusive.

CONCLUSION

Our results add a new layer of complexity in sepsis-induced immune alterations by highlighting the functional heterogeneity of monocytes. The impact on clinical outcomes and how pharmacological interventions to reverse monocyte deactivation may target the different functional subsets are unanswered questions that deserve further investigations using high-resolution microfluidic assay.

REFERENCES

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
2. 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 Aug;32(8):1175–83.
3. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec;13(12):862–74.
4. 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 Nov;36(11):1859–66.
5. Avraham R, Haseley N, Brown D, Penaranda C, Jijon HB, Trombetta JJ, et al. Pathogen Cell-to-Cell Variability Drives Heterogeneity in Host Immune Responses. *Cell*. 2015 Sep;162(6):1309–21.
6. Shalek AK, Satija R, Adiconis X, Gertner RS, Gaublomme JT, Raychowdhury R, et al. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature*. 2013 Jun 13;498(7453):236–40.
7. Bounab Y, Eyer K, Dixneuf S, Rybczynska M, Chauvel C, Mistretta M, et al. Dynamic single-cell phenotyping of immune cells using the microfluidic platform DropMap. *Nat Protoc*. 2020;15(9):2920–55.
8. Gossez M, Rimmelé T, Andrieu T, Debord S, Bayle F, Malcus C, et al. Proof of concept study of mass cytometry in septic shock patients reveals novel immune alterations. *Sci Rep [Internet]*. 2018 Dec [cited 2020 Apr 29];8(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-35932-0>
9. Williams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*. 2014 Aug;14(8):571–8.
10. Tak T, van Groenendael R, Pickkers P, Koenderman L. Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *J Innate Immun*. 2017;9(5):464–74.
11. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med*. 2017 Jul 3;214(7):1913–23.
12. Shalova IN, Lim JY, Chittechath M, Zinkernagel AS, Beasley F, Hernández-Jiménez E, et al. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity*. 2015 Mar 17;42(3):484–98.
13. Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*. 2019 Oct;574(7779):575–80.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JFL designed the study, performed cytometric experiments and drafted the manuscript. YB designed the study and performed microfluidic experiments. CR performed cytometric experiments. SD and BR performed statistical analysis. JT and JDC designed the study. FP and CV designed the study and drafted the manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

JFL, CR, JDC and FP have no conflict of interest to declare. YB, SD, BR, JT and CV are employees from BIOASTER. YB and CV are inventors on a patent application based on certain ideas described in this manuscript and may receive financial compensation via their employer's rewards to inventors scheme.

TABLES

Table 1: Main characteristics of healthy donors and septic shock patients.

Identification	Sex	Age	Sepsis source	SOFA	SAPSII	First lactate	WBC count	Monocytes count
Patient 1	Male	43	Lung	7	77	9.3	3.5	0
Patient 2	Male	70	Lung	21	87	8.6	1.8	0.05
Patient 3	Male	59	Lung	9	54	3.6	34.2	1.12
Patient 4	Male	86	Urinary tract	2	45	2.6	40.2	0.96
Patient 5	Male	31	Lung	8	76	2	16.9	0.86
Patient 6	Female	73	Meningeal	2	39	4.4	11.9	0.5
Patient 7	Male	80	Lung	4	37	2.3	14.3	0.8
Healthy donor 1	Male	50						
Healthy donor 2	Female	30						
Healthy donor 3	Male	48						
Healthy donor 4	Male	45						
Healthy donor 5	Female	21						
Healthy donor 6	Female	40						
Healthy donor 7	Male	49						
Healthy donor 8	Female	50						
Healthy donor 9	Male	49						
Healthy donor 10	Female	44						

Age is expressed in years, SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SAPSII: simplified acute physiology score II; WBC: white blood cells.

FIGURES

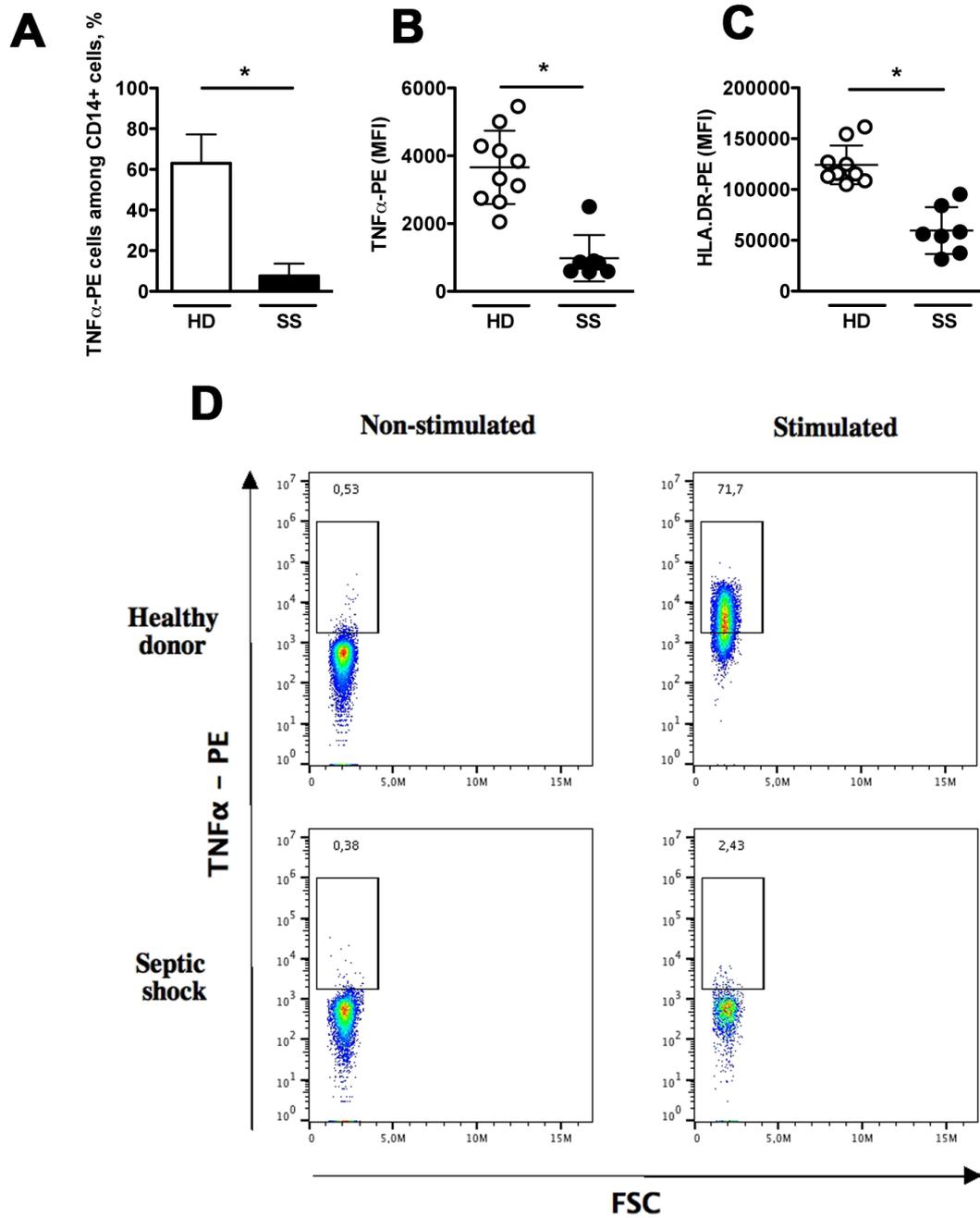


Figure 1: Flow cytometry assessment of monocyte deactivation in septic shock patients.

Monocytes were stimulated in vitro with 1 μ g/mL LPS for 180 minutes. **(A)**: Proportions of TNF α positive monocytes in healthy donors (n=10) and septic shock

patients (n=7). **(B, C)**: TNF α intra-cellular staining and HLA-DR membrane expression.**(D)**: Representative dot-plots of intracellular production of TNF α . Data are expressed as mean and standard deviation.

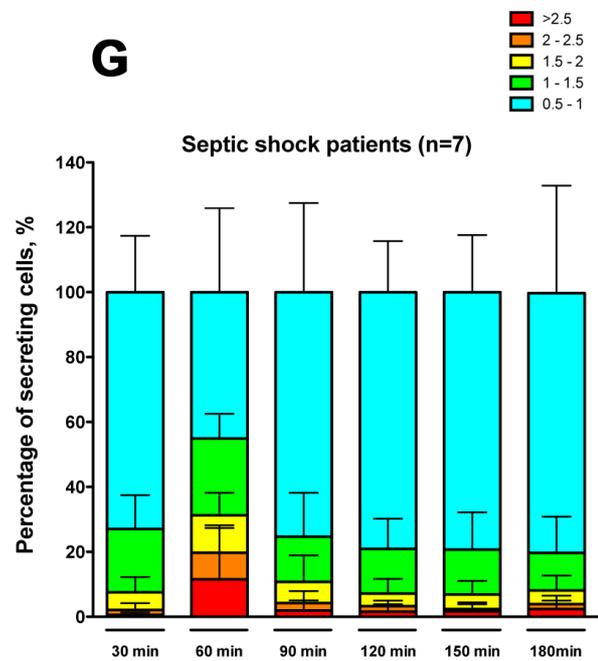
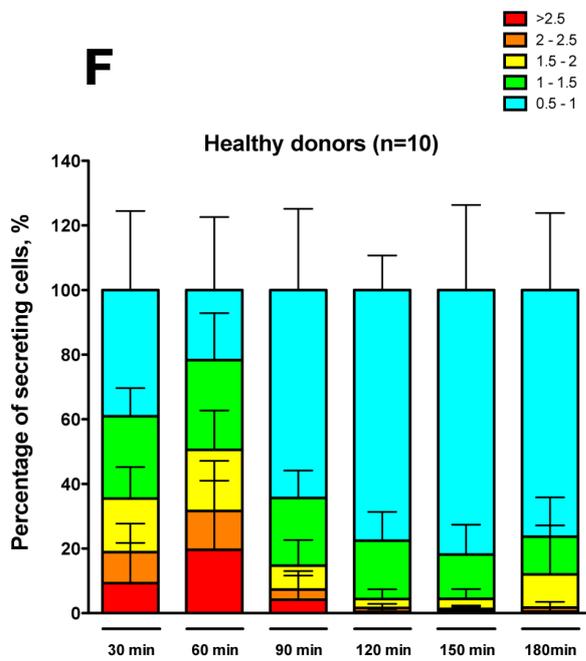
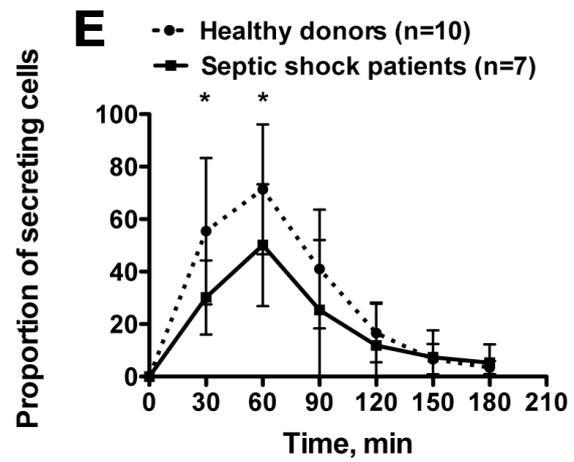
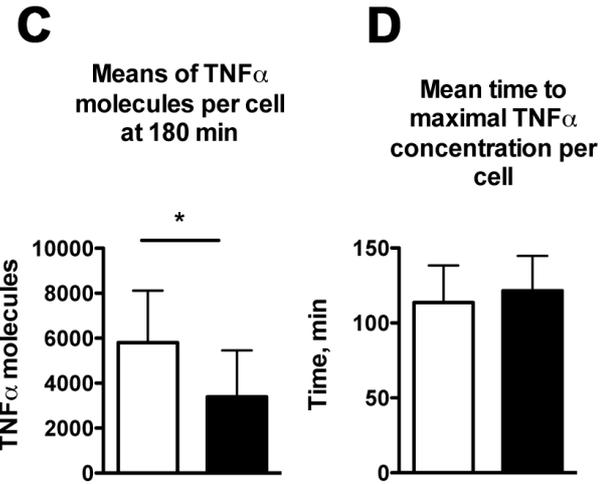
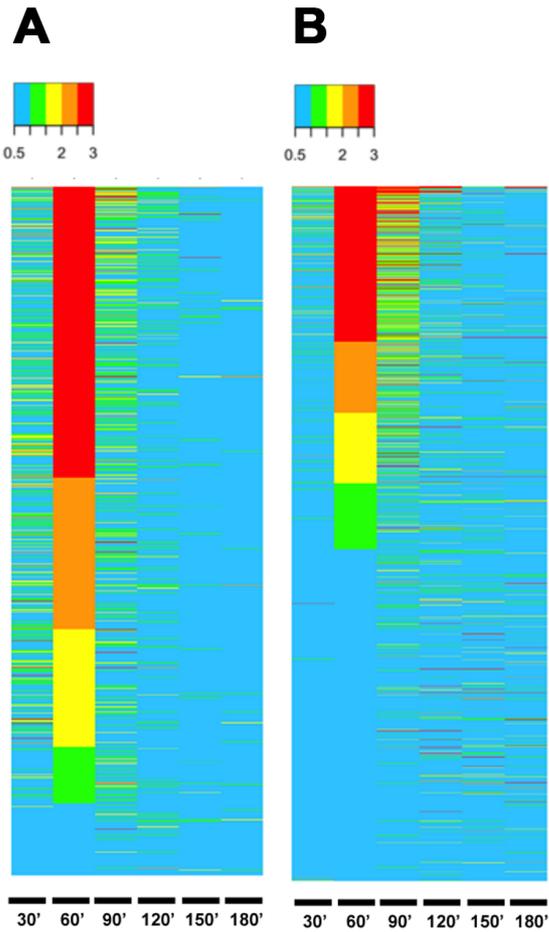
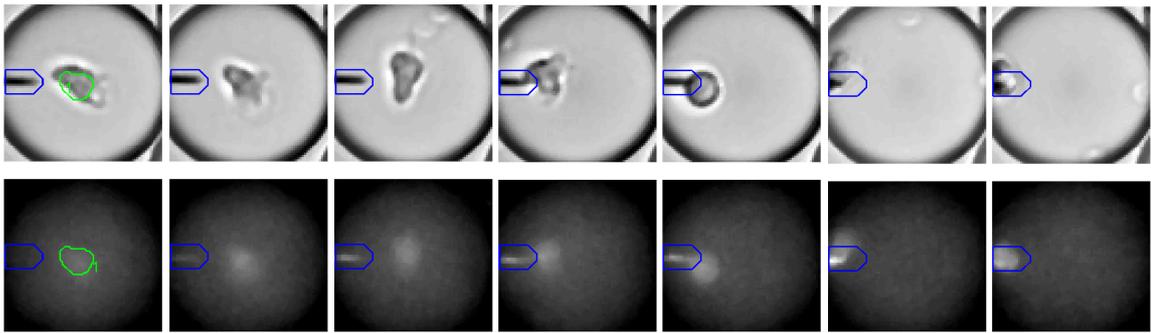
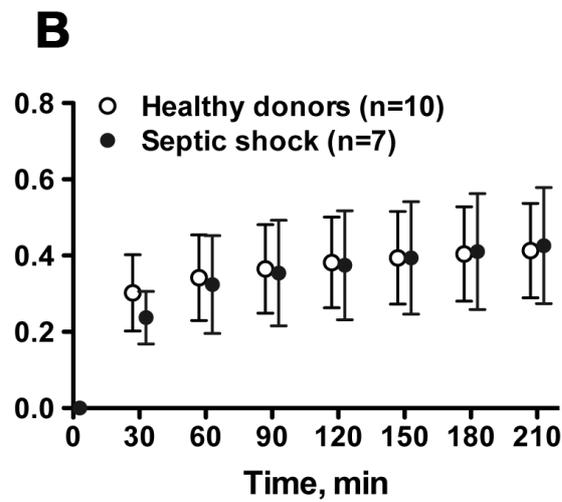
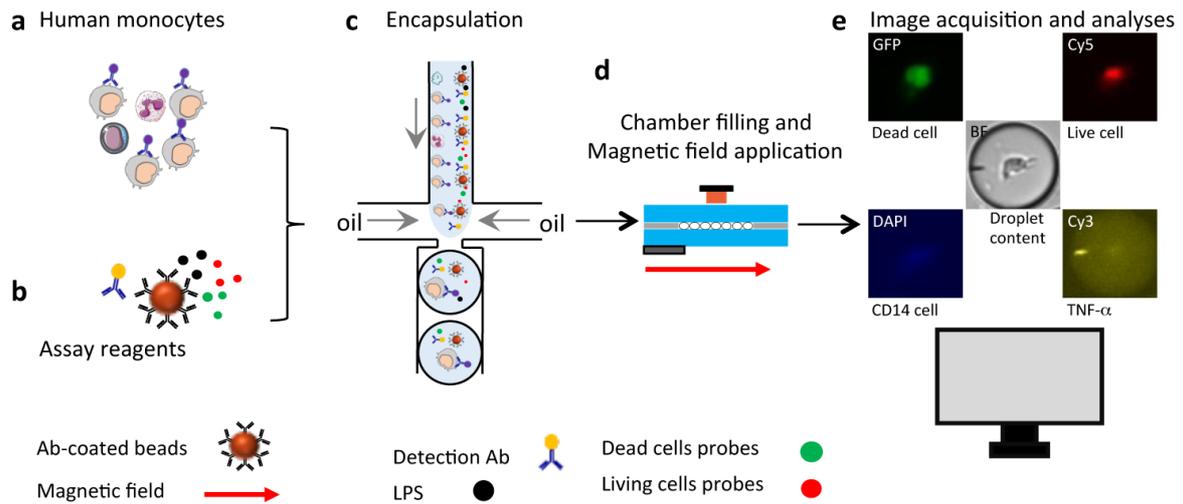


Figure 2: Single-cell dynamic microfluidic analysis of monocyte TNF α secretion under LPS stimulation.

Microfluidic analysis allows single-cell dynamic monitoring of TNF α secretion at different time points. **(A, B)**: Heatmaps expressing TNF α secretion rate over time in a healthy donor (988 cells) **(A)** and in a septic shock patient (1021 cells) **(B)**. Cells were clustered based on their TNF α secretion rate at 60 min. Secretion rate is expressed in TNF α molecules per second. **(C)** Means of maximal amount of TNF α molecules in cells. **(D)**: Mean time to reach the maximal concentration of TNF α in each cells. **(E)**: Proportion of monocytes secreting TNF α (molecules/sec) over time after in-vitro LPS stimulation. **(F, G)**: Proportion of secreting monocytes clustered with TNF α secretion rates over time in healthy donors **(F)** and septic shock **(G)**. *: p<0.05.

A**B**
Cumulative proportion of phagocytosing cells**Figure 3: Single cell dynamic microfluidic monitoring of monocyte phagocytosis**

(A): Kinetics of phagocytosis activity of one monocyte starting at 90 min. Brightfield images (upper panel) illustrate cell migration toward the beadline (from center to the left of the droplet). Fluorescence images (lower panel) show the impact of phagocytosis on the beadline fluorescence signal (fuzzy fluorescence signal at 180 min due to the loss of beadline integrity). (B): Cumulative proportions of monocytes with phagocytosis of the magnetic beadline over 180 min after LPS stimulation.



Supplementary figure 1: Schematic overview of cytokine secretion assay in droplet.

(a) Human monocytes were isolated from human blood and stained with a fluorescent anti-CD14 antibody. (b) Nanoparticle functionalization and bioassay preparation. The bioassay comprises magnetic nanobeads (300nm diameter) functionalized with anti-TNF α antibodies, fluorescent-labeled anti-TNF α detection antibodies, live cell probes (red dots), dead cell probes (green dots) and LPS ligand (black dots). (c) Co-encapsulation of monocytes and assay reagents into 50-pL droplets in a microfluidic device. (d) Emulsion transfer into a glass chamber to form a monolayer array of droplets. (e) Time-lapse imaging of droplets using an epifluorescence microscope (37°C) and automated image analysis using in-house droplet-tracking software.

DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence l'existence d'une hétérogénéité des réponses immunitaires post-septiques à l'échelle de l'individu, des organes mais aussi au niveau cellulaire. Nous avons pour cela utilisé une approche translationnelle en partant d'une observation clinique originale, justifiant le développement de modèles murins pertinents de sepsis qui demeurent irremplaçables pour évaluer la mécanistique de ces mécanismes immunologiques complexes et compartimentalisés. La modulation de la source infectieuse initiale nous a ainsi permis de mettre en évidence l'hétérogénéité quantitative et fonctionnelle des macrophages alvéolaires. Enfin, chez les patients septiques, l'utilisation d'une plateforme de microfluidique nous a permis d'évaluer l'hétérogénéité des réponses au LPS des monocytes circulants.

I. Autour de l'hétérogénéité du risque d'infections secondaires observée en pratique clinique

A. De potentiels facteurs de risque liés à la prise en charge

Nous avons montré qu'une infection pulmonaire primaire est associée à une susceptibilité particulière à une pneumonie nosocomiale chez des patients pris en charge pour choc septique. A notre connaissance, une seule autre étude a pris en compte la source anatomique du sepsis dans l'évaluation du risque d'infection nosocomiale (2), retrouvant une moindre fréquence des pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) chez les patients avec un sepsis abdominal. Nous avons formulé dans notre hypothèse de travail expérimental que l'origine anatomique infectieuse pourrait entraîner des modifications quantitatives et/ou qualitatives des cellules immunitaires innées au niveau pulmonaire. Toutefois, il est intéressant de noter que les thérapeutiques utilisées dans la prise en charge des infections graves sont susceptibles d'avoir des effets immunomodulateurs sur le système immunitaire, notamment la ventilation mécanique et l'antibiothérapie dans le cadre des PAVM.

La ventilation mécanique invasive est le principal facteur de risque de survenue de PAVM, notamment lié à des micro-inhalations répétées autour du

ballonnet de la sonde d'intubation (147). Cependant, la durée de ventilation mécanique ne modifie pas de façon significative les résultats obtenus dans notre analyse multivariée, suggérant qu'il existe d'autres éléments à prendre en compte dans ce risque lié à la ventilation mécanique. Dans les modèles expérimentaux, ventiler un poumon infecté induit des lésions tissulaires et des dysfonctions cellulaires épithéliales et endothéliales (160). De façon très intéressante, une équipe a montré que des souris avec abolition d'expression pulmonaire de *Piezo1*, un canal ionique sensible à la pression, ne pouvaient plus mettre en place de réponse immunitaire innée anti-infectieuse (161).

L'utilisation d'antibiotiques est aussi une piste de réflexion intéressante dans le contexte des PAVM, compte-tenu de leur impact sur les microbiotes respiratoire et digestif. Si les poumons ont longtemps été considérés comme stériles, des études récentes ont démontré l'existence d'un microbiote pulmonaire dont les principaux représentants sont les genres *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium* et *Haemophilus* (162). De plus, de nombreuses données suggèrent qu'il existe des rapports étroits entre le microbiote intestinal et le microbiote respiratoire passant par des composés microbiens et/ou des métabolites issus du catabolisme bactérien (162). Il a été montré chez l'homme et chez la souris une colonisation du poumon par des bactéries du tractus digestif au dépend des bactéries du microbiote respiratoire (163) dans les suites d'une infection abdominale. Les bactéries du microbiote respiratoire basal et celles issues du microbiote intestinal participent à la résistance anti-infectieuse en promouvant la synthèse de GM-CSF (164).

Ainsi, des facteurs liés à la prise en charge du patient semblent moduler la réponse immunitaire pulmonaire à une agression infectieuse. Nous avons aussi identifié dans le contexte pandémique des différences de susceptibilité à une agression secondaire liée au pathogène.

B. Un possible facteur de risque lié à la nature du pathogène

Dans le contexte pandémique lié au SARS-CoV-2, nous avons évalué le risque de survenue d'une pneumonie nosocomiale chez des patients pris en charge pour une pneumonie virale (liée au SARS-CoV-2 ou au virus de la grippe) ou

bactérienne. Après ajustement sur de potentiels facteurs confondants tels que l'âge, la sévérité initiale ou la durée de ventilation mécanique, il apparaît que la survenue d'une pneumonie à SARS-CoV-2 expose à un risque plus important de pneumonie nosocomiale en comparaison d'une pneumonie grippale ou bactérienne. Ces résultats suggèrent qu'au delà du site anatomique infectieux, la nature du pathogène pourrait influencer la susceptibilité à une agression secondaire.

Initialement, les premières données ont suggéré l'existence d'une phase initiale pro-inflammatoire chez les patients présentant une COVID-19 sévère, ne différant cependant pas des choc septiques (134). Les études *single-cell* de lavages broncho-alvéolaires ont montré une dérégulation complexe de la réponse immunitaire pulmonaire chez les patients ayant une COVID-19 sévère (165). Dans le compartiment circulant, une des caractéristiques de cette affection est la diminution de la réponse immunitaire médiée par les interférons de type I (166), une augmentation des neutrophiles circulants et une diminution des monocytes CD14^{low} CD16^{high} (167).

Il a été aussi rapporté l'existence de modifications de l'immunité dans les suites d'une infection par le SARS-CoV-2 affectant la majorité des cellules myéloïdes avec une augmentation des neutrophiles immatures, une myélopoïèse d'urgence et une diminution de l'expression de l'HLA-DR monocyttaire (167). Il existe aussi une profonde déplétion en lymphocytes T CD4 et en cellules NK (156). En comparaison des patients ayant un sepsis bactérien, ceux ayant une infection à SARS-CoV-2 présentent une moindre sécrétion d'IFN γ et de TNF α après stimulation des PBMC par du LPS (157). Ainsi, il a été observé des anomalies communes, telles que la diminution de l'expression de HLA-DR monocyttaire, chez les patients post-sepsis bactérien et post-COVID, mais aussi des anomalies plus spécifiques. Ainsi, probablement que les voies d'activation de la réaction immunitaire (TLR, NLR) n'expliquent pas à elles seules ces différences observées.

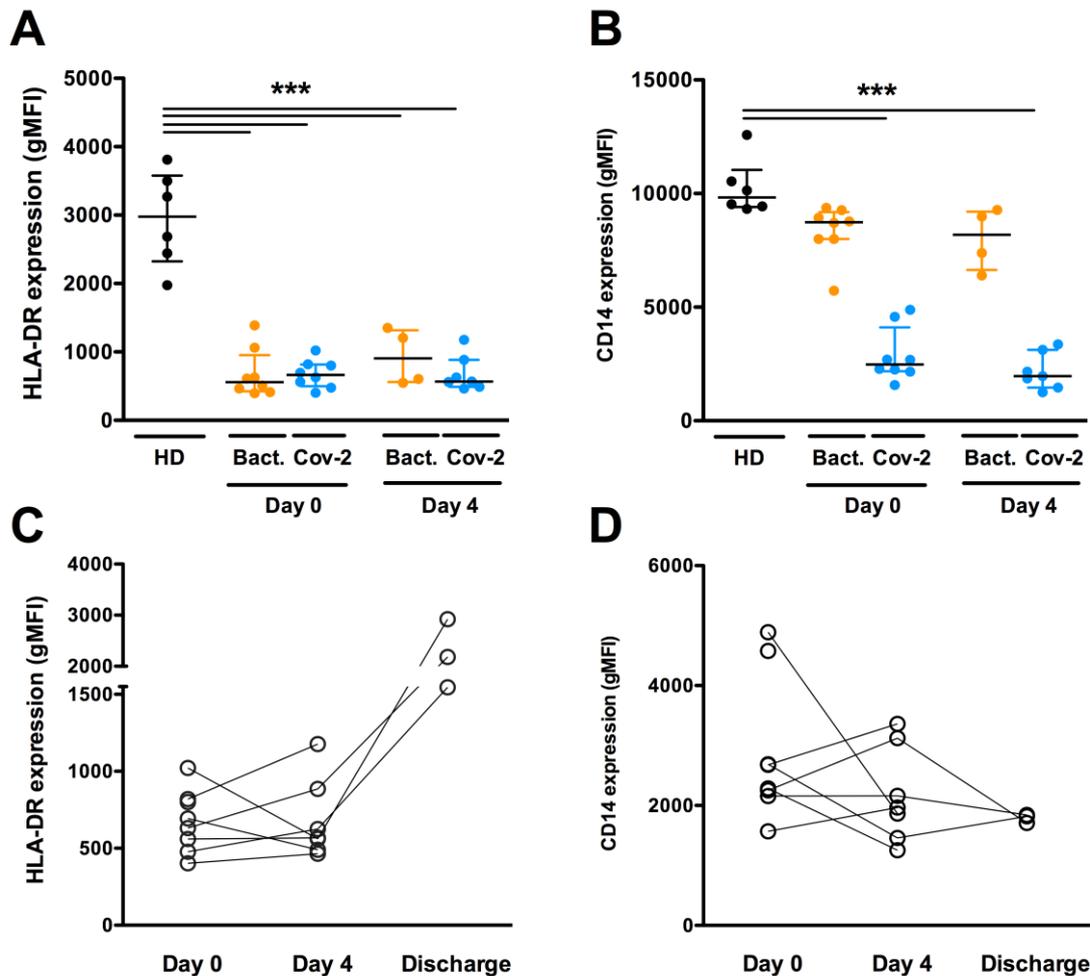


Figure 14 : Expression de HLA-DR et du CD14 sur les monocytes circulants de patients ayant un COVID sévère (n= 8) en comparaison de patients ayant un sepsis bactérien (n=8 dont 3 chocs septiques) et de donneurs sains (n=6), mesuré le jour de l'admission et le 4^{ème} jour (Panel A et B). Evolution temporelle de l'expression membranaire de HLA-DR et du CD14 à la surface des monocytes circulants à l'admission, au 4^{ème} jour et à la sortie des 8 patients ayant une COVID-19 sévère (panel C et D).

Nous avons pu comparer l'expression de HLA-DR et du CD14 sur les monocytes circulants de patients ayant une COVID-19 sévère (n=8) en comparaison de patients ayant un sepsis bactérien (n=8 dont 3 chocs septiques) et de donneurs sains (n=6). A la fois les patients ayant un sepsis et une COVID-19 présentent une diminution importante et soutenue de HLA-DR monocytaire. En revanche, l'expression du CD14 est diminuée de façon soutenue isolément chez les patients ayant une COVID-19 (**Figure 14**). Ces résultats suggèrent que la nature du pathogène puisse modifier la nature de la désactivation monocytaire, ici en modulant le niveau d'expression du CD14, co-récepteur de TLR4 pour la reconnaissance du LPS (158).

Ainsi, il existe à la fois des facteurs liés à la prise en charge mais aussi au pathogène pouvant modifier la susceptibilité pulmonaire à une agression secondaire infectieuse. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette hétérogénéité à l'échelle cellulaire, nous avons évalué les réponses immunitaires pulmonaires en faisant varier la source infectieuse, mettant ainsi en évidence des phénotypes opposés des macrophages alvéolaires.

II. Autour des modifications phénotypiques des macrophages alvéolaires

Nos résultats expérimentaux montrent que l'origine pulmonaire ou extra-pulmonaire du sepsis module la polarisation de l'immunité pulmonaire et la susceptibilité envers une agression secondaire avec des modifications phénotypiques et quantitatives des macrophages alvéolaires. En effet, nous avons observé que les macrophages alvéolaires CD11c⁺ Siglec-F⁺ étudiés après une péritonite polymicrobienne présentent des caractéristiques tolérogènes alors que ceux identifiés après une pneumonie présentent des caractéristiques compatibles avec une *trained immunity*. Ces phénotypes sont deux modalités opposées de l'adaptation des cellules immunitaires innées à une première agression infectieuse. En effet, des travaux récents ont montré la capacité de certaines cellules immunitaires, telles que les macrophages ou les cellules NK, à développer des modifications fonctionnelles post-infectieuses soutenues et stables dans le temps, reposant sur des modifications épigénétiques et transcriptomiques. A l'inverse, il a déjà été bien décrit l'existence d'une tolérance immunitaire innée à l'égard d'une seconde agression pendant laquelle une cellule immunitaire restimulée n'arrive pas à initier la transcription des gènes mis en jeu dans ses fonction anti-infectieuses (**Figure 15**).

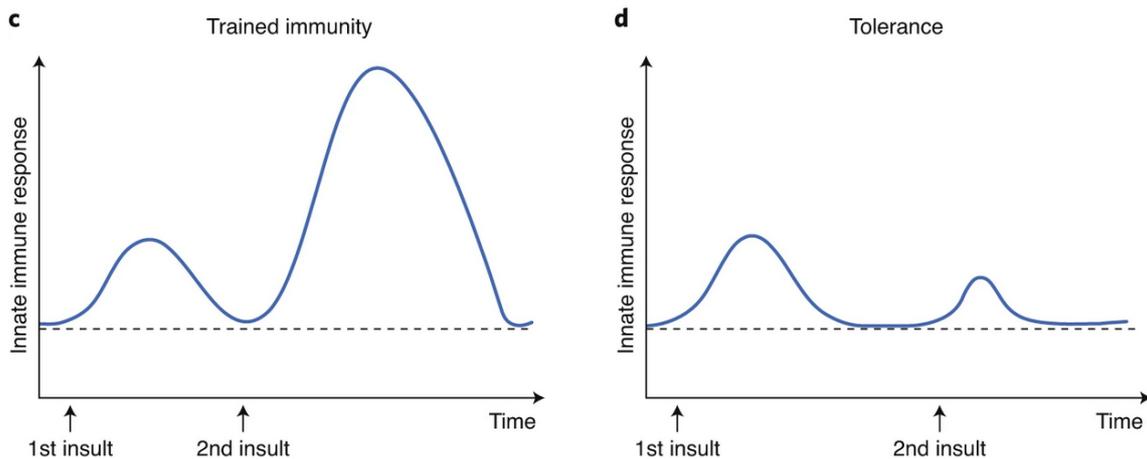


Figure 15 : Représentation schématique du comportement des cellules immunitaires innées durant les différents programmes adaptatifs que sont la *trained immunity* (panel de gauche) et le profil tolérogène (panel de droite). D'après (159).

A. Le niveau d'expression du CMH-II comme reflet de l'activation des macrophages alvéolaires

L'identification des macrophages alvéolaires issus de pneumonie comme cellules ayant un profil de « *trained immunity* » repose à la fois sur l'expression membranaire du CMH-II mais aussi sur le profil transcriptomique. Dans les suites d'une pneumonie, les cellules pulmonaires CD11c⁺ Siglec-F⁺ ont une augmentation de l'expression membranaire du CMH-II. A l'opposé, les cellules pulmonaires CD11c⁺ Siglec-F⁺ ont quant à elles une diminution de l'expression membranaire du CMH-II. L'anticorps (souche M5/114.15.2) utilisé reconnaissant les haplotypes H2-Ab, H2-Ad, H2-Aq, H2-Ed et H2-Ek du CMH de classe II murin, l'absence de profil plurimodal suggère qu'il s'agit d'une variation globale de l'appareil de présentation de l'antigène. Chez l'Homme, il a été rapporté une diminution du niveau d'expression de l'HLA-DR à la surface des macrophages alvéolaires dans les suites d'un traumatisme (160) ou d'une chirurgie cardiaque (161), cette diminution étant associée à un risque accru de pneumonie nosocomiale. L'originalité de notre résultat est de suggérer que la diminution de l'expression du CMH-II sur les macrophages alvéolaires est associée à un risque accru de pneumonie nosocomiale mais aussi que son hyper-expression est associée à un risque moindre. Ainsi, l'expression du CMH-II sur les macrophages alvéolaires apparaît comme un marqueur potentiel de l'état d'activation

du macrophage alvéolaire. Toutefois, ce rôle du CMH de classe II dans l'immunité pulmonaire médiée par le macrophage alvéolaire est surprenant dans la mesure où il s'agit d'une cellule essentiellement phagocytaire et que le CMH-II joue avant tout un rôle dans la présentation de l'antigène.

Il est intéressant de noter que les molécules du CMH ont été identifiées comme exerçant des fonctions autres que celle de présentation de l'antigène. En particulier, plusieurs travaux suggèrent que le CMH de classe II joue un rôle important dans la réponse des récepteurs TLR à une stimulation. Ces travaux sont issus d'une littérature ancienne ayant montré qu'une diminution ou une abolition de l'expression du CMH-II entraîne une diminution de la production cytokinique des macrophages après stimulation au LPS (162,163). En 2010, Liu et collègues ont montré que cet effet passait par le maintien de l'activité de la kinase Btk (164). Toutefois, les mécanismes qui contrôlent ces variations dans l'expression du CMH-II restent à préciser.

B. Le profil transcriptomique des macrophages alvéolaires

Nous avons aussi réalisé une analyse transcriptionnelle des cellules pulmonaires CD11c⁺ Siglec-F⁺ issues de chaque condition expérimentale, qui retrouve une modification du profil transcriptomique vers un enrichissement des voies de signalisations du métabolisme lipidique et glycolytique après pneumonie en comparaison de la condition post-CLP. Ce résultat est en faveur d'un profil de *trained immunity* des macrophages alvéolaires étudiés après une pneumonie.

Les progrès récents en immunométabolisme et en épigénétique ont permis d'identifier que les profils de *trained immunity* et de tolérance sont deux modalités d'un seul phénomène finement régulées par des modifications épigénétiques et métaboliques. L'analyse métabolomique et transcriptomique de monocytes humains préalablement stimulés au β -glucane ont mis en avant une interaction forte entre la glycolyse et la glutaminolyse dans la mise en place de la *trained immunity*. Ces monocytes accumulent le fumarate, métabolite du cycle de Krebs, qui influence la

reprogrammation épigénétique en régulant à la baisse l'activité des histones déméthylases KDM5 (165). De plus, différents intermédiaires du cycle de Krebs exercent des effets distincts sur l'activité des cellules immunitaires innées. Par exemple, l' α -cétoglutarate favorise l'activation anti-inflammatoire des macrophages via une reprogrammation épigénétique médiée par la déméthylase H3K27 JMJD3 et facilite la tolérance à l'endotoxine après activation au LPS ou par l'IFN γ des macrophages (166). Pour consolider nos résultats, nous pourrions utiliser comme modalité diagnostique du phénotype de *trained immunity* une évaluation de l'acidification du milieu extra-cellulaire (ECAR, extracellular acidification rate) (94).

III. Autour des modifications quantitatives des macrophages alvéolaires

A. Provenance ontogénique des macrophages alvéolaires accumulés

Au delà des modifications phénotypiques observées dans les populations de macrophages alvéolaires, nous avons pu observer des modifications quantitatives avec une diminution soutenue et continue en macrophages alvéolaires dans les poumons issus de souris ayant été soumises à une péritonite polymicrobienne. A l'inverse, la survenue du pneumonie entraîne une accumulation en macrophages alvéolaires permettant une clairance plus rapide dans le contexte d'une infection pulmonaire secondaire.

En conditions inflammatoires, les données issues de la littérature concernant l'origine et le renouvellement des macrophages alvéolaires sont contradictoires. Certains travaux suggèrent un auto-renouvellement indépendant des cellules circulantes (83,94,97) alors que d'autres mettent en évidence le recrutement de monocytes circulants (91,92). Nous avons recherché dans nos travaux à déterminer l'origine des cellules pulmonaires CD11c⁺ Siglec-F⁺ identifiées. Au travers de la réalisation de chimères de moelle osseuses issues de souris CD45.1⁺ (donneuses) et CD45.2⁺ (receveuses). Malheureusement, aucune de nos deux approches (greffe après irradiation médullaire ou après radiomimétiques) ne nous a permis de mettre

au point un modèle robuste et fiable. Nous avons néanmoins évalué l'expression de CX₃CR₁ et du CD115 dans la mesure où ces deux marqueurs sont reportés comme étant absent à la surface des macrophages alvéolaires d'origine embryonnaire (81). De façon surprenante, le taux d'expression du CX₃CR₁ et du CD115 à la surface des cellules pulmonaires CD11c⁺ Siglec-F⁺ était important chez les souris naïves. Une autre approche serait d'utiliser des souris parabiontes ou des souris *Ccr2*^{-/-} chez lesquelles les cellules monocytaires circulantes sont quasiment absentes.

Nos résultats sont en accord avec les données publiées jusqu'alors. Il existe des données dans la littérature montrant des différences quantitatives en macrophages tissulaires après une agression non locale, l'amplitude et la direction de cette variation dépendant à la fois de l'organe considéré mais aussi du type de d'agression tissulaire (5). Toutefois, les déterminants qui régulent ces variations quantitatives restent non identifiés à ce jour. Nous avons identifié un rôle important des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs (Tregs) dans ce phénomène.

B. Association entre macrophages alvéolaires et lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Nous avons identifié au sein du microenvironnement pulmonaire un rôle central joué par les lymphocytes T CD4⁺ FoxP3⁺ T régulateurs (Tregs). Leur rôle a déjà été étudié dans les pathologies infectieuses, avec un effet bénéfique ou délétère selon les études. En effet, il a été rapporté un effet délétère de leur accumulation au travers de l'induction d'une expansion des CLI de type 2 médiée par l'IL33 (29) et la différenciation des cellules dendritiques vers un profil tolérogène médié par le TGFβ (146). Cependant, il a aussi été rapporté un effet bénéfique de l'expansion des Tregs via la réparation tissulaire du tissu épithélial par les voies du TGFβ et de l'amphireguline (167,168).

Les données concernant les interactions entre macrophages alvéolaires et Tregs concordent vers un effet bénéfique (169,170), bien que les modèles utilisés varient de façon importante entre les études, suggérant une influence importante de

la source infectieuse. Nos résultats vont dans ce sens puisque une déplétion en Tregs après une LPC améliore la clairance bactérienne en augmentant le nombre absolu de macrophages alvéolaires au sein du poumon. A l'inverse, leur déplétion après une pneumonie rétablit une clairance comparable aux contrôles et restaure une quantité de macrophages alvéolaires également comparable aux contrôles. Une autre étude montre qu'une déplétion en Tregs augmente le nombre de cellules immunitaires (y compris les macrophages alvéolaires) dans les suites d'une administration intra-trachéale de LPS (167). Si les mécanismes précis qui sous-tendent cette observation restent largement méconnus, nous avons identifié un rôle central de la voie de signalisation TLR2.

C. La voie de signalisation du TLR2 contrôle l'expansion des lymphocytes Tregs

Nous avons étudié le rôle de TLR2 dans la mesure où nous avons précédemment rapporté que les souris *tlr2^{-/-}* chez lesquelles était induite un CLP n'étaient pas sensibles à une deuxième agression infectieuse (20) et parce que TLR2 est connu pour contrôler l'expansion des Treg dans le contexte de la septicémie (35). Cette observation est intéressante en raison de l'importante distribution d'expression des TLR à la surface des cellules qui en font un bon candidat pour la détection des effets à distance des infections. Les TLR2 reconnaissent de nombreux agents pathogènes, y compris les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. L'hétérodimérisation de TLR2 avec TLR1 ou TLR6 est la première étape menant à l'activation de l'inflammation via la voie MyD88 (36). Si la fonction centrale de la signalisation par les TLR soit d'activer la réponse immunitaire innée, de plus en plus de preuves suggèrent un rôle immunomodulateur à la fois direct et indirect du TLR, en particulier sur les Treg. Par exemple, les Treg se développent sans cellules présentatrices d'antigène et perdent transitoirement leurs capacités suppressives en présence de l'agoniste TLR2 Pam3Cys-SK4 (37) tandis que l'inversion de l'anergie Treg dépend des cytokines produites par les cellules dendritiques activées par TLR (38). Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence la complexité de la réponse immunitaire suite à une agression infectieuse avec des effets directs et indirects du microenvironnement sur les cellules effectrices.

IV. Autour de l'exemple de la désactivation monocytaire comme modèle d'investigation de l'hétérogénéité des réponses immunitaires

Nos résultats ont mis en évidence l'existence d'une hétérogénéité des vitesses et capacités de production de TNF α en réponse à une stimulation par LPS des monocytes circulants issus de patients septiques. Ainsi, le phénomène de tolérance au LPS des monocytes de patients septiques est une manifestation macroscopique homogène résultant de la sommation de comportements cellulaires hétérogènes. De façon intéressante, cette différence est elle aussi retrouvée chez les volontaires sains. Ainsi, nos données suggèrent que la survenue d'une infection affecte l'intensité et l'orientation d'un phénomène présent à l'état homéostatique.

Le concept d'hétérogénéité est ancien, universellement partagé au sein des systèmes biologiques, et est le reflet appréciable du phénomène de stochasticité. L'investigation des mécanismes qui la sous-tendent a fait l'objet d'un regain d'intérêt les dernières années avec l'avènement des techniques d'analyse unicellulaire et d'outils puissants de calcul (171). Chez les bactéries, la survenue de mutations sans déterminisme a été depuis longtemps identifiée comme un avantage en terme de survie de l'espèce en permettant l'apparition de phénotypes plus résistants à l'environnement. En revanche, la nature de l'effet de l'hétérogénéité et de la diversité du système immunitaire sur l'être humain reste à déterminer. Si l'hétérogénéité des réponses anti-infectieuses à l'échelle des individus se fait essentiellement chez l'Homme, la variabilité des réponses immunitaire à l'échelle cellulaire est faite sur des modèles animaux. Une des forces de notre travail est d'avoir pu mettre de telles différences en évidence chez l'Homme pour pouvoir aller plus loin dans la compréhension des mécanismes sous-jacents.

A. L'hypothèse des différences de stade développemental cellulaire

Nos résultats ont montré que chez les volontaires sains, la proportion de cellules sécrétant du TNF α après stimulation au LPS est variable. Parmi les cellules sécrétant du LPS, il existe aussi des différences de vitesse de sécrétion. En postulant l'existence de profils transcriptomiques sous-jacents différents, les déterminants de cette variabilité sont nombreux et peuvent être schématiquement classés en deux catégories que sont 1/ des paramètres intrinsèques (tels que le stade du cycle cellulaire ou des modifications épigénétiques) et 2/ des paramètres extrinsèques tels que l'influence du milieu ou les communications intercellulaires. Dès lors, les monocytes circulants sont un modèle intéressant dans la mesure où l'influence du milieu cellulaire et où les communications intercellulaires sont possiblement moindres. De plus, nous avons utilisé une technologie où chaque cellule est individualisée au sein d'une gouttelette avec un milieu standardisé, ce qui réduit considérablement l'influence de ces deux paramètres au moment de la stimulation par LPS. Ainsi, nos données plaident en faveur d'une influence prédominante des paramètres intrinsèques aux cellules dans la variabilité des réponses observées. Shalek et collègues ont montré à partir de cellules dendritiques issues de moelle osseuse de souris (BMDC, *Bone marrow-derived dendritic cells*) stimulées au LPS l'existence de réponses bimodales pour certains gènes codant pour la réponse pro-inflammatoire. De plus, les auteurs ont montré que les cellules ayant des réponses transcriptomiques différentes étaient à un stade de développement différent (140). Toutefois, certaines données de la littérature suggèrent que des facteurs extrinsèques seraient à prendre en compte.

B. L'hypothèse du contrôle de l'activité cellulaire par le milieu

La désactivation monocytaire est appréciée par le biais de deux caractéristiques, d'une part la diminution de la synthèse de TNF α après stimulation au LPS (appelée « tolérance à l'endotoxine ») et d'autre part une diminution de l'expression membranaire de HLA-DR. La diminution de l'expression de cytokines

pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF α après stimulation au LPS chez les patients septiques a été mise en évidence chez l'homme à partir du sang total (141), de monocytes (33) et de PBMC (172). En revanche, la stimulation de macrophages péritonéaux ou alvéolaires humains par du LPS après une péritonite (173) ou un SDRA infectieux (174) produit le phénotype inverse, avec une augmentation de production de cytokines pro-inflammatoires. Fitting et collègues ont montré chez la souris que l'administration de LPS entraînait une tolérance au LPS dans la plupart des compartiments (péritoine, rate, moelle osseuse) mais pas dans le poumon. Si tous ces travaux ont des limites importantes, en particulier en lien avec la caractérisation des cellules utilisées, ils montrent que le milieu exerce un effet important sur l'orientation fonctionnelle des cellules immunitaires.

CONCLUSION

Nous avons pu mettre en évidence chez les patients pris en charge pour un choc septique un risque accru de pneumonie acquise sous ventilation mécanique dans les suites d'une première agression pulmonaire. Cette observation a fondé le rationnel d'une modélisation expérimentale chez l'animal visant à évaluer les réponses immunes pulmonaires au décours d'une première agression infectieuse pulmonaire ou extra-pulmonaire. Par ailleurs, dans le contexte pandémique, nous avons identifié que la COVID-19 était indépendamment associée à un risque accru de pneumonie nosocomiale, suggérant ainsi que l'infection à SARS-CoV-2 induit des altérations particulières de l'immunité pulmonaire.

Ainsi, nous avons étudié la réponse pulmonaire au cours de la phase d'immunosuppression post-septique en modulant le site d'infection primaire dans des modèles murins d'infection respiratoire et extra-respiratoire. Nous avons identifié une susceptibilité accrue à une pneumonie secondaire dans les suites d'une infection extra-respiratoire et une résistance dans les suites d'une pneumonie initiale. Ces différences sont associées à des anomalies quantitatives et fonctionnelles des macrophages alvéolaires. Ces anomalies sont associées à des variations quantitatives des Tregs dans le poumon dépendant de la voie de signalisation TLR2 et régulant les nombres de macrophages alvéolaires. Enfin, nous avons ainsi pu

mettre en évidence l'existence d'une variabilité temporelle importante et d'une grande hétérogénéité des réponses monocytaires chez les patients septiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. van Vught LA, Klein Klouwenberg PMC, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, et al. Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA*. 2016 Apr 12;315(14):1469–79.
2. Philippart F, Bouroche G, Timsit J-F, Garrouste-Orgeas M, Azoulay E, Darmon M, et al. Decreased Risk of Ventilator-Associated Pneumonia in Sepsis Due to Intra-Abdominal Infection. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137262.
3. Burnham KL, Davenport EE, Radhakrishnan J, Humburg P, Gordon AC, Hutton P, et al. Shared and Distinct Aspects of the Sepsis Transcriptomic Response to Fecal Peritonitis and Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Aug 1;196(3):328–39.
4. Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, Seta N, Dombret MC, Crestani B, et al. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Sep;150(3):710–6.
5. Hoyer FF, Naxerova K, Schloss MJ, Hulsmans M, Nair AV, Dutta P, et al. Tissue-Specific Macrophage Responses to Remote Injury Impact the Outcome of Subsequent Local Immune Challenge. *Immunity*. 2019 Nov;51(5):899-914.e7.
6. Avraham R, Haseley N, Brown D, Penaranda C, Jijon HB, Trombetta JJ, et al. Pathogen Cell-to-Cell Variability Drives Heterogeneity in Host Immune Responses. *Cell*. 2015 Sep;162(6):1309–21.
7. Beutler B, Rietschel ETh. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. 2003 Feb;3(2):169–76.
8. Gery I, Gershon RK, Waksman BH. Potentiation of cultured mouse thymocyte responses by factors released by peripheral leucocytes. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1971 Dec;107(6):1778–80.
9. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 1975 Sep 1;72(9):3666–70.
10. Tracey K, Beutler B, Lowry S, Merryweather J, Wolpe S, Milsark I, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*. 1986 Oct 24;234(4775):470–4.
11. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest*. 1988 Apr 1;81(4):1162–72.
12. Bone RC. The Pathogenesis of Sepsis. *Ann Intern Med*. 1991 Sep 15;115(6):457.
13. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010 Jan 15;327(5963):291–5.
14. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:257–90.
15. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primer [Internet]*. 2016 Dec 22 [cited 2021 Apr 1];2(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201645>
16. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010 Jan;20(1):34–50.
17. Sprung CL, Schultz DR, Marcial E, Caralis PV, Gelbard MA, Arnold PI, et al. Complement activation in septic shock patients. *Crit Care Med*. 1986 Jun;14(6):525–8.
18. Levi M, van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb Res*. 2017 Jan;149:38–44.
19. MacLean LD, Meakins JL, Taguchi K, Duignan JP, Dhillon KS, Gordon J. Host Resistance in Sepsis and Trauma: *Ann Surg*. 1975 Sep;182(3):207–17.
20. Meakins JL, Pietsch JB, Christou NV, Maclean LD. Predicting surgical infection before the operation. *World J Surg*. 1980 Jul;4(4):439–49.

21. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1994 May 15;152(10):5014–21.
22. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Jun 1;166(11):6952–63.
23. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. Early Circulating Lymphocyte Apoptosis in Human Septic Shock Is Associated with Poor Outcome: Shock. 2002 Dec;18(6):487–94.
24. Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A, Malcus C, Poitevin-Later F, Grives A, et al. Decreased T-Cell Repertoire Diversity in Sepsis: A Preliminary Study*. *Crit Care Med*. 2013 Jan;41(1):111–9.
25. 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 Dec 21;306(23):2594–605.
26. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec;13(12):862–74.
27. Venet F, Chung C-S, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25+CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009 Apr;35(4):678–86.
28. Huang H, Xu R, Lin F, Bao C, Wang S, Ji C, et al. High circulating CD39+ regulatory T cells predict poor survival for sepsis patients. *Int J Infect Dis*. 2015 Jan;30:57–63.
29. Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, Ferreira RG, Colón DF, Donate PB, et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nat Commun*. 2017 Apr 4;8:14919.
30. Cavassani KA, Carson WF, Moreira AP, Wen H, Schaller MA, Ishii M, et al. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4403–11.
31. Hack CE, Nuijens JH, Strack van Schijndel RJM, Abbink JJ, Eerenberg AJM, Thijs LG. A model for the interplay of inflammatory mediators in sepsis—a study in 48 patients. *Intensive Care Med*. 1990 Mar;16(S3):S187–91.
32. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frölich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *The Lancet*. 1998 Mar;351(9107):950–3.
33. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991 Nov;88(5):1747–54.
34. Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Rackow EC. Altered Leukocyte Immunophenotypes in Septic Shock. *Chest*. 1993 Sep;104(3):847–53.
35. 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 Dec 1;166(11):1475–82.
36. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, et al. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May 15;169(10):1144–51.
37. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 1997 Jun;3(6):678–81.
38. Payen D, Faivre 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 [Internet]*. 2019 Dec [cited 2020 Jun 3];19(1). Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4526-x>
39. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Mar 1;168(5):2493–500.
40. Grimaldi D, Louis S, Pène F, Sirgo G, Rousseau C, Claessens YE, et al. Profound

- and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2011 Sep;37(9):1438–46.
41. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk H-D, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care.* 2009;13(4):R119.
 42. Pastille E, Didovic S, Brauckmann D, Rani M, Agrawal H, Schade FU, et al. Modulation of Dendritic Cell Differentiation in the Bone Marrow Mediates Sustained Immunosuppression after Polymicrobial Sepsis. *J Immunol.* 2011 Jan 15;186(2):977–86.
 43. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis M-A, Plassais J, Jallades L, et al. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol.* 2015 Dec;98(6):1081–90.
 44. Stephan F, Yang K, Tankovic J, Soussy C-J, Dhonneur G, Duvaldestin P, et al. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients: *Crit Care Med.* 2002 Feb;30(2):315–22.
 45. Guérin E, Orabona M, Raquil M-A, Giraudeau B, Bellier R, Gibot S, et al. Circulating Immature Granulocytes With T-Cell Killing Functions Predict Sepsis Deterioration*: *Crit Care Med.* 2014 Sep;42(9):2007–18.
 46. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers J-W, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest.* 2012 Jan 3;122(1):327–36.
 47. Ost M, Singh A, Peschel A, Mehling R, Rieber N, Hartl D. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2016 Mar 31 [cited 2021 Apr 1];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcimb.2016.00037/abstract>
 48. Janols H, Bergenfelz C, Allaoui R, Larsson A-M, Rydén L, Björnsson S, et al. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol.* 2014 Nov;96(5):685–93.
 49. Uhel F, Azzaoui I, Grégoire M, Pangault C, Dulong J, Tadié J-M, et al. Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Aug;196(3):315–27.
 50. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS: *Crit Care Med.* 1996 Jul;24(7):1125–8.
 51. Tang BM, Huang SJ, McLean AS. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Crit Care.* 2010;14(6):R237.
 52. Cavillon J, Adib-conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine Cascade in Sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003 Jan;35(9):535–44.
 53. Tamayo E, Fernández A, Almansa R, Carrasco E, Heredia M, Lajo C, et al. Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *Eur Cytokine Netw.* 2011 Jun;22(2):82–7.
 54. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1999 Jan 1;162(1):392–9.
 55. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun.* 1996;64(11):4733–8.
 56. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2018 Feb;14(2):121–37.
 57. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med.* 2011 Dec 19;208(13):2581–90.
 58. Januel J-M, Harbarth S, Allard R, Voirin N, Lepape A, Allaouchiche B, et al. Estimating Attributable Mortality Due to Nosocomial Infections Acquired in Intensive Care Units. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010 Apr;31(4):388–94.
 59. ECDC. European Center for Disease Prevention and Control - Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. *Annual Epidemiological Report 2016.* 2016;

60. Suetens C, Latour K, Kärki T, Ricchizzi E, Kinross P, Moro ML, et al. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2018 Nov;23(46).
61. Daviaud F, Grimaldi D, Dechartres A, Charpentier J, Geri G, Marin N, et al. Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care* [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 Mar 1];5(1). Available from: <http://www.annalsofintensivecare.com/content/5/1/16>
62. Heininger A, Haeberle H, Fischer I, Beck R, Riessen R, Rohde F, et al. Cytomegalovirus reactivation and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2011;15(2):R77.
63. Cytomegalovirus Reactivation in Critically Ill Immunocompetent Patients. *JAMA.* 2008 Jul 23;300(4):413.
64. von Muller L, Klemm A, Weiss M, Schneider M, Suger-Wiedeck H, Durmus N, et al. Active Cytomegalovirus Infection in Patients with Septic Shock. *Emerg Infect Dis.* 2006 Oct;12(10):1517–22.
65. Kollef MH, Kollef KE. Antibiotic utilization and outcomes for patients with clinically suspected ventilator-associated pneumonia and negative quantitative BAL culture results. *Chest.* 2005 Oct;128(4):2706–13.
66. Pène F, Zuber B, Courtine E, Rousseau C, Ouaz F, Toubiana J, et al. Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 Dec 15;181(12):8513–20.
67. Benjamim CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Septic Mice Are Susceptible to Pulmonary Aspergillosis. *Am J Pathol.* 2003 Dec;163(6):2605–17.
68. Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, Dauter S, Gibot S, et al. Hospital-acquired pneumonia in ICU. *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2018 Feb;37(1):83–98.
69. Bekaert M, Timsit J-F, Vansteelandt S, Depuydt P, Vésin A, Garrouste-Orgeas M, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a reappraisal using causal analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Nov 15;184(10):1133–9.
70. Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RHH, Bergmans DCJJ, Camus C, Bauer TT, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis.* 2013 Aug;13(8):665–71.
71. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N Engl J Med.* 2015 Jul 30;373(5):415–27.
72. Dickson RP. The microbiome and critical illness. *Lancet Respir Med.* 2016 Jan;4(1):59–72.
73. Man WH, de Steenhuijsen Piters WAA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(5):259–70.
74. Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol.* 2017 Mar;10(2):299–306.
75. Gordon S. Phagocytosis: The Legacy of Metchnikoff. *Cell.* 2016 Aug;166(5):1065–8.
76. van Furth R, Cohn ZA. THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. *J Exp Med.* 1968 Sep 1;128(3):415–35.
77. Fogg DK. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science.* 2006 Jan 6;311(5757):83–7.
78. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko A-C, Krijgsveld J, et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol.* 2013 Aug;14(8):821–30.
79. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity.* 2016 Mar;44(3):439–49.
80. Paul F, Arkin Y, Giladi A, Jaitin DA, Kenigsberg E, Keren-Shaul H, et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell.* 2015 Dec;163(7):1663–77.
81. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate Mapping Reveals

- Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*. 2013 Jan;38(1):79–91.
82. Williams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Pijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med*. 2013 Sep 23;210(10):1977–92.
83. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):792–804.
84. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbins SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity*. 2013 Sep;39(3):599–610.
85. Mass E, Ballesteros I, Farlik M, Halbritter F, Gunther P, Crozet L, et al. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science*. 2016 Sep 9;353(6304):aaf4238–aaf4238.
86. Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, et al. C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*. 2015 Apr;42(4):665–78.
87. Schneider C, Nobs SP, Kurrer M, Rehrauer H, Thiele C, Kopf M. Induction of the nuclear receptor PPAR- γ by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1026–37.
88. Yao Y, Liu Q, Adrianto I, Wu X, Glassbrook J, Khalasawi N, et al. Histone deacetylase 3 controls lung alveolar macrophage development and homeostasis. *Nat Commun [Internet]*. 2020 Dec [cited 2021 Mar 17];11(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-17630-6>
89. Yu X, Buttgereit A, Lelios I, Utz SG, Cansever D, Becher B, et al. The Cytokine TGF- β Promotes the Development and Homeostasis of Alveolar Macrophages. *Immunity*. 2017 Nov;47(5):903-912.e4.
90. Williams M, Svedberg FR. Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Nat Immunol*. 2021 Feb;22(2):118–27.
91. Aegerter H, Kulikauskaite J, Crotta S, Patel H, Kelly G, Hessel EM, et al. Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nat Immunol*. 2020 Feb;21(2):145–57.
92. Machiels B, Dourcy M, Xiao X, Javaux J, Mesnil C, Sabatel C, et al. A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat Immunol*. 2017 Dec 1;18(12):1310–20.
93. Goritzka M, Makris S, Kausar F, Durant LR, Pereira C, Kumagai Y, et al. Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J Exp Med*. 2015 May 4;212(5):699–714.
94. Yao Y, Jeyanathan M, Haddadi S, Barra NG, Vaseghi-Shanjani M, Damjanovic D, et al. Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell*. 2018 Nov;175(6):1634-1650.e17.
95. Maus UA, Janzen S, Wall G, Srivastava M, Blackwell TS, Christman JW, et al. Resident Alveolar Macrophages Are Replaced by Recruited Monocytes in Response to Endotoxin-Induced Lung Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Aug;35(2):227–35.
96. Jardine L, Wiscombe S, Reynolds G, McDonald D, Fuller A, Green K, et al. Lipopolysaccharide inhalation recruits monocytes and dendritic cell subsets to the alveolar airspace. *Nat Commun [Internet]*. 2019 Dec [cited 2021 Mar 17];10(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-019-09913-4>
97. Roquilly A, Jacqueline C, Davieau M, Mollé A, Sadek A, Fourgeux C, et al. Alveolar macrophages are epigenetically altered after inflammation, leading to long-term lung immunoparalysis. *Nat Immunol*. 2020 Jun;21(6):636–48.
98. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*. 2014 Feb;14(2):81–93.
99. Kaufmann SHE, Dorhoi A. Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria

Interactions. *Immunity*. 2016 Mar;44(3):476–91.

100. Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP. Integrative Physiology of Pneumonia. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1417–64.

101. Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG, et al. Alveolar Macrophage Apoptosis Contributes to Pneumococcal Clearance in a Resolving Model of Pulmonary Infection. *J Immunol*. 2003 Nov 15;171(10):5380–8.

102. Steinwede K, Henken S, Bohling J, Maus R, Ueberberg B, Brumshagen C, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice. *J Exp Med*. 2012 Oct 22;209(11):1937–52.

103. Marriott HM, Bingle CD, Read RC, Braley KE, Kroemer G, Hellewell PG, et al. Dynamic changes in Mcl-1 expression regulate macrophage viability or commitment to apoptosis during bacterial clearance. *J Clin Invest*. 2005 Feb 1;115(2):359–68.

104. Fan EKY, Fan J. Regulation of alveolar macrophage death in acute lung inflammation. *Respir Res* [Internet]. 2018 Dec [cited 2021 Mar 11];19(1). Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-018-0756-5>

105. Pittet LA, Quinton LJ, Yamamoto K, Robson BE, Ferrari JD, Algül H, et al. Earliest Innate Immune Responses Require Macrophage RelA during Pneumococcal Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Sep;45(3):573–81.

106. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):27–35.

107. Quinton LJ, Mizgerd JP. NF- κ B and STAT3 signaling hubs for lung innate immunity. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan;343(1):153–65.

108. Dudek M, Puttur F, Arnold-Schrauf C, Kühl AA, Holzmann B, Henriques-Normark B, et al. Lung epithelium and myeloid cells cooperate to clear acute pneumococcal infection. *Mucosal Immunol*. 2016 Sep;9(5):1288–302.

109. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med*. 2008 Mar;14(3):275–81.

110. Chen K, Eddens T, Trevejo-Nunez G, Way EE, Elsegeiny W, Ricks DM, et al. IL-17 Receptor Signaling in the Lung Epithelium Is Required for Mucosal Chemokine Gradients and Pulmonary Host Defense against *K. pneumoniae*. *Cell Host Microbe*. 2016 Nov 9;20(5):596–605.

111. Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol*. 2018 Jan;11(1):21–34.

112. Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, Lyonga D, Vekaria S, Edwards L, et al. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat Immunol*. 2008 Sep;9(9):1074–83.

113. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin α v β 6 binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 1999 Feb 5;96(3):319–28.

114. Shibata Y, Berclaz PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*. 2001 Oct;15(4):557–67.

115. Westphalen K, Gusarova GA, Islam MN, Subramanian M, Cohen TS, Prince AS, et al. Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature*. 2014 Feb 27;506(7489):503–6.

116. Craig A, Mai J, Cai S, Jeyaseelan S. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect Immun*. 2009 Feb;77(2):568–75.

117. Doerschuk CM, Allard MF, Martin BA, MacKenzie A, Autor AP, Hogg JC. Marginated pool of neutrophils in rabbit lungs. *J Appl Physiol*. 1987 Nov 1;63(5):1806–15.

118. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159–75.

119. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.

120. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of

- neutrophils. *J Clin Invest*. 2016 02;126(5):1612–20.
121. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015 Jan 15;517(7534):293–301.
122. McKenzie ANJ, Spits H, Eberl G. Innate lymphoid cells in inflammation and immunity. *Immunity*. 2014 Sep 18;41(3):366–74.
123. Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science*. 2015 Nov 20;350(6263):981–5.
124. Pan D, Amison RT, Rifo-Vasquez Y, Spina D, Cleary SJ, Wakelam MJ, et al. P-Rex and Vav Rac-GEFs in platelets control leukocyte recruitment to sites of inflammation. *Blood*. 2015 Feb 12;125(7):1146–58.
125. Lê VB, Schneider JG, Boergeling Y, Berri F, Ducatez M, Guerin J-L, et al. Platelet Activation and Aggregation Promote Lung Inflammation and Influenza Virus Pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Apr;191(7):804–19.
126. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity*. 2014 Dec;41(6):886–97.
127. Chen K, Kolls JK. T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:605–33.
128. Smith NM, Wasserman GA, Coleman FT, Hilliard KL, Yamamoto K, Lipsitz E, et al. Regionally compartmentalized resident memory T cells mediate naturally acquired protection against pneumococcal pneumonia. *Mucosal Immunol*. 2018;11(1):220–35.
129. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):523–32.
130. Thome JJC, Bickham KL, Ohmura Y, Kubota M, Matsuoka N, Gordon C, et al. Early-life compartmentalization of human T cell differentiation and regulatory function in mucosal and lymphoid tissues. *Nat Med*. 2016 Jan;22(1):72–7.
131. D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, West EE, Willett MH, Britos MF, et al. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest*. 2009 Oct;119(10):2898–913.
132. Aggarwal NR, Tsushima K, Eto Y, Tripathi A, Mandke P, Mock JR, et al. Immunological priming requires regulatory T cells and IL-10-producing macrophages to accelerate resolution from severe lung inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 May 1;192(9):4453–64.
133. Jouan Y, Guillon A, Gonzalez L, Perez Y, Boisseau C, Ehrmann S, et al. Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. *J Exp Med*. 2020 Dec 7;217(12):e20200872.
134. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med*. 2020 Dec;8(12):1233–44.
135. Mudd PA, Crawford JC, Turner JS, Souquette A, Reynolds D, Bender D, et al. Distinct inflammatory profiles distinguish COVID-19 from influenza with limited contributions from cytokine storm. *Sci Adv*. 2020 Dec;6(50):eabe3024.
136. Hiruma T, Tsuyuzaki H, Uchida K, Trapnell BC, Yamamura Y, Kusakabe Y, et al. IFN- β Improves Sepsis-related Alveolar Macrophage Dysfunction and Postseptic Acute Respiratory Distress Syndrome-related Mortality. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018 Jul;59(1):45–55.
137. Chinnaiyan AM, Huber-Lang M, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Shankar-Sinha S, Sarma VJ, et al. Molecular signatures of sepsis: multiorgan gene expression profiles of systemic inflammation. *Am J Pathol*. 2001 Oct;159(4):1199–209.
138. McIntyre J, Rowley D, Jenkin CR. The functional heterogeneity of macrophages at the single cell level. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1967 Dec;45(6):675–80.
139. Claudi B, Spröte P, Chirkova A, Personnic N, Zankl J, Schürmann N, et al. Phenotypic variation of *Salmonella* in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy. *Cell*. 2014 Aug 14;158(4):722–33.

140. Shalek AK, Satija R, Adiconis X, Gertner RS, Gaublomme JT, Raychowdhury R, et al. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature*. 2013 Jun 13;498(7453):236–40.
141. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*. 1995 Mar 1;85(5):1341–7.
142. Fitting C, Dhawan S, Cavaillon J-M. Compartmentalization of tolerance to endotoxin. *J Infect Dis*. 2004 Apr 1;189(7):1295–303.
143. van Vught LA, Wiewel MA, Hoogendijk AJ, Scicluna BP, Belkasim-Bohoudi H, Horn J, et al. Reduced Responsiveness of Blood Leukocytes to Lipopolysaccharide Does not Predict Nosocomial Infections in Critically Ill Patients. *Shock*. 2015 Aug;44(2):110–4.
144. Shalova IN, Lim JY, Chittechath M, Zinkernagel AS, Beasley F, Hernández-Jiménez E, et al. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity*. 2015 Mar 17;42(3):484–98.
145. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016 Apr 22;352(6284):aaf1098–aaf1098.
146. Roquilly A, McWilliam HEG, Jacqueline C, Tian Z, Cinotti R, Rimbart M, et al. Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity*. 2017 18;47(1):135-147.e5.
147. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2016 Sep 1;63(5):e61–111.
148. Suki B, Hubmayr R. Epithelial and endothelial damage induced by mechanical ventilation modes. *Curr Opin Crit Care*. 2014 Feb;20(1):17–24.
149. Solis AG, Bielecki P, Steach HR, Sharma L, Harman CCD, Yun S, et al. Mechanosensation of cyclical force by PIEZO1 is essential for innate immunity. *Nature*. 2019;573(7772):69–74.
150. Wypych TP, Wickramasinghe LC, Marsland BJ. The influence of the microbiome on respiratory health. *Nat Immunol*. 2019 Oct;20(10):1279–90.
151. Dickson RP, Singer BH, Newstead MW, Falkowski NR, Erb-Downward JR, Standiford TJ, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nat Microbiol [Internet]*. 2016 Oct [cited 2019 Oct 15];1(10). Available from: <http://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016113>
152. Brown RL, Sequeira RP, Clarke TB. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat Commun*. 2017 Nov 15;8(1):1512.
153. 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 [Internet]*. 2020 May 12 [cited 2020 Jun 2]; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41591-020-0901-9>
154. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 2020 07;369(6504):718–24.
155. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Baßler K, Schlickeiser S, Zhang B, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell*. 2020 17;182(6):1419-1440.e23.
156. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea 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 10;27(6):992-1000.e3.
157. Remy KE, Mazer M, Striker DA, Ellebedy AH, Walton AH, Unsinger J, et al. Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections. *JCI Insight*. 2020 03;5(17).
158. Anas A, Poll T, de Vos AF. Role of CD14 in lung inflammation and infection. *Crit Care*. 2010;14(2):209.
159. Divangahi M, Aaby P, Khader SA, Barreiro LB, Bekkering S, Chavakis T, et al.

- Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. *Nat Immunol.* 2021;22(1):2–6.
160. Muehlstedt SG, Lyte M, Rodriguez JL. Increased IL-10 production and HLA-DR suppression in the lungs of injured patients precede the development of nosocomial pneumonia. *Shock Augusta Ga.* 2002 Jun;17(6):443–50.
161. Chalk K, Meisel C, Spies C, Volk T, Thuenemann K, Linneweber J, et al. Dysfunction of alveolar macrophages after cardiac surgery and postoperative pneumonia?—An observational study. *Crit Care Lond Engl.* 2013 Dec 9;17(6):R285.
162. Beharka AA, Armstrong JW, Chapes SK. Macrophage cell lines derived from major histocompatibility complex II-negative mice. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998 Jun;34(6):499–507.
163. Piani A, Hossle JP, Birchler T, Siegrist CA, Heumann D, Davies G, et al. Expression of MHC class II molecules contributes to lipopolysaccharide responsiveness. *Eur J Immunol.* 2000 Nov;30(11):3140–6.
164. Liu X, Zhan Z, Li D, Xu L, Ma F, Zhang P, et al. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nat Immunol.* 2011 May;12(5):416–24.
165. Arts RJW, Novakovic B, ter Horst R, Carvalho A, Bekkering S, Lachmandas E, et al. Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity. *Cell Metab.* 2016 Dec;24(6):807–19.
166. Liu P-S, Wang H, Li X, Chao T, Teav T, Christen S, et al. α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol.* 2017 Sep;18(9):985–94.
167. Mock JR, Garibaldi BT, Aggarwal NR, Jenkins J, Limjunyawong N, Singer BD, et al. Foxp3⁺ regulatory T cells promote lung epithelial proliferation. *Mucosal Immunol.* 2014 Nov;7(6):1440–51.
168. Arpaia N, Green JA, Molledo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell.* 2015 Aug;162(5):1078–89.
169. Soroosh P, Doherty TA, Duan W, Mehta AK, Choi H, Adams YF, et al. Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3⁺ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med.* 2013 Apr 8;210(4):775–88.
170. Coleman MM, Ruane D, Moran B, Dunne PJ, Keane J, Mills KHG. Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013 Jun;48(6):773–80.
171. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol.* 2017 Jan;17(1):21–9.
172. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care Lond Engl.* 2012 Jun 28;16(3):R112.
173. Fieren MW, Van den Bemd GJ, Bonta IL. Endotoxin-stimulated peritoneal macrophages obtained from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients show an increased capacity to release interleukin-1 beta in vitro during infectious peritonitis. *Eur J Clin Invest.* 1990 Aug;20(4):453–7.
174. Jacobs RF, Tabor DR, Burks AW, Campbell GD. Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Dec;140(6):1686–92.