

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE: 2017

THÈSE 2017 TOU3 - 2051

THÈSE

POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Barnabé DANIAU

PROFIL IMMUNITAIRE DES PATIENTS
DE RÉANIMATION EN CHOC SEPTIQUE

Le jeudi 21 septembre 2017

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur François VERGEZ

JURY:

Président : Madame la Professeure Maha AYYOUB

1er assesseur : Monsieur le Professeur Eric DELABESSE

2ème assesseur : Monsieur le Docteur Stanislas FAGUER

3ème assesseur : Monsieur le Docteur Michaël PERES

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 17 février 2017

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
Mme FOURASTÉ I.	Pharmacognosie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIÉ P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires		Universitaires	
M. CHATELUT E.	Pharmacologie	Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. FAVRE G.	Biochimie	Mme BARRE A.	Biologie
M. HOUIN G.	Pharmacologie	Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
M. PARINI A.	Physiologie	Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie	Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie	Mme COUDERC B.	Biochimie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie	M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique	Mme DOISNEAU-SIXOU S.	Biochimie
M. VALENTIN A.	Parasitologie	M. FABRE N.	Pharmacognosie
		M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
		Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
		Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
		Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
		M. SALLES B.	Toxicologie
		M. SÉGUI B.	Biologie Cellulaire
		M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
		Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
		M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maitres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie
Mme GANDIA-MAILLY P. (*)	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S.	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. Olichon A.	Biochimie
PEM. PERE D.	Pharmacognosie
Mme PORTHE G.	Immunologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE A.	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C.	Physiologie
Mme FONTAN C.	Biophysique
Mme KELLER L.	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique

Remerciements :

À Madame la Professeure Maha AYYOUB, Professeure des Universités à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse.

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Je vous remercie de votre confiance, de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail et vous prie d'accepter mes considérations les plus respectueuses.

À Monsieur le Professeur Eric DELABESSE, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Chef de service du Laboratoire d'Hématologie au CHU de Toulouse.

Je vous remercie de m'avoir permis la réalisation de ce travail en m'accueillant, une nouvelle fois, dans votre service pour clôturer mon internat. Vous me faites maintenant l'honneur d'accepter de le juger, je vous prie d'accepter l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Stanislas FAGUER, Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier dans le service de Réanimation au CHU de Toulouse.

Je te remercie d'avoir accepté d'encadrer ce sujet de thèse en équipe avec François. Merci aussi pour ta gentillesse et ta disponibilité pour que ce travail avance au mieux et au plus vite. Veuille trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

À Monsieur le Docteur Michaël PERES, Assistant Hospitalo – Universitaire.

Merci encore d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse ; une évidence du fait de ta familiarité avec le sujet et de notre amitié de longue date. Merci aussi pour tes relectures, ta disponibilité et ton soutien. A tous ces bons moments déjà passés ensemble et à ceux à venir.

À Monsieur le Docteur François VERGEZ, Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier au Laboratoire d'Hématologie au CHU de Toulouse.

Je te remercie de m'avoir fait l'honneur de me confier et d'encadrer ce sujet de thèse. Merci aussi pour ta bonne humeur quotidienne, ta réactivité, ta disponibilité à toute épreuve et surtout pour les dimanches et les nuits passés seul dans le noir à trier des cellules à l'oncopôle. Plus sérieusement, merci pour tout ce que tu m'as appris au cours de ces deux semestres en Hématologie à Toulouse.

Merci également à Madame Marie-Laure Nicolau-Travers, ingénieur, pour sa patience, sa compétence et sa disponibilité pour le recueil des données de cytométrie et pour m'avoir soutenu dans l'interprétation des résultats.

Je remercie tous mes maîtres, biologistes, techniciens, internes que j'ai eu la chance de croiser au cours de mon internat, que ce soit à Bordeaux (trop nombreux... mais je ne peux pas oublier Julien qui m'a initié à la Bactério et qui est devenu un ami), à Toulouse en hématologie (François, Cécile Demur, Jill, Véronique, JB, Fred, Sophie, Vincent, Felipe, et de nombreux autres), en Nouvelle Calédonie, à Cahors (Nathalie, Claire, Lucile) ou à Bayonne (Aguire-papa, Fanny-maman, Yo-bro, David, Anne-Christine, Marie-Laure, Rémi) grâce auxquels j'ai pu accumuler les connaissances et l'expérience qui me permettent aujourd'hui d'achever ma formation sereinement et sans regrets. Merci !

Ensuite, procédons chronologiquement.

Merci avant tout à ma mère et mon père qui ont été d'un soutien constant et indispensable au cours de ces quelques (peut-être interminables) années d'études, et surtout dans les années de concours parfois difficiles. Merci à Anto et Popo, mes frères et sœurs (sans oublier Marie et Javi) qui ont été ma joie dans l'enfance et qui le sont toujours dans la vie d'adulte que ça soit ici ou aux confins du Pacifique. Merci à cette magnifique famille, cousins, cousines, oncles et tantes, grands-parents qui m'ont permis, toutes ces années, de grandir baigné d'amour et de bonheur. Que ces cousinades à droite et à gauche ne cessent jamais !

On a dit chronologiquement...

Merci aux amis d'enfance, les mirevalois : Jerem, Vincent, Jean, Paul, Jérôme et Seb, Léo, CT, et tous les autres. Tant de belles années et d'étés inoubliables. De cabanes en films dans les collines, de répets en concerts de métal dans les garages et enfin de fêtes estivales en soirées mirevalaises ou toulousaines, on aura tout vécu à toutes les époques. On aura su évoluer sans se perdre de vue malgré la distance. Que ça dure !

Vient le temps de la fac...

Que de belles amitiés se seront créées sur les bancs de la fac. Indéboulonnables amitiés. Mon vieux Carlito, à faire des conneries depuis le début, Vincent le potentialisateur, toujours motivé, toujours présent, le roi des embuscades, et Cécé, le vieux loup de Seb au regard coquin, Gary et notre eurotrip

en amoureux, Arnaud et Auré les rois de la plongée (à quand la croisière ?), Ludo le parrain de Leucate, Omar la mafia grand maître des souterrains de la fac et Annek, Claude le kanak, Nicoco la boîte à bruit, et encore Sylvain, sans oublier le basque, Julien, Anne-so, Cathy, Romain, Semsem, Thibaut, Robin, JB, Nico N, Virgi, La Pouge, Alexis, Titi et Elisa... La liste est longue, j'en passe et des meilleurs ! Merci pour ces belles années inoubliables (... et les quelques milliers d'heures de soirées oubliées) !

Puis le temps de l'internat...

Tellement de bons souvenirs ! De belles années de décadence et d'amitié, notamment à la coloc' bordelaise avec Hugo, Alex et Mimil ! On était vraiment pas mal quand même ! Des voyages à la roots au Sri Lanka et en Colombie avec Hugo, Flo et Fab et les 6 mois de Calédo avec Hugo et Marie ! Un nombre infini de bouffes, d'apéros, de soirées bordelaises, toulousaines, de férias, un peu de sport quand même et des virées à droite et à gauche et qui se poursuivent encore. Beaucoup de belles rencontres à Bordeaux avec Serri, Sylvain, Samy, Marine LB, Marine J, Florence, Carole, Cécile, Mariya et les chaminous, Chloé, Catoch, Adrien (Professeur), Marion, Clémence, Laure, Lolo et Morgane, Nono, Anne et Bastien, Pierre B, l'étrange père macquère, Yannick et Ludo (encore !), Julien... et plein d'autres ! Et le retour à Toulouse avec encore de belles rencontres à l'internat avec François et Margaux et Margaux, Loïc et Quentin les idiots, Caro, Félicien et les autres ! Manu et Morgane, Julien, Thomas, Agnès, Pierre-Yves, Angèle, Jules et Alice-anne, Louis-Tho, Antho, Cédric, Etienne, Grégoire, Aurélie et Arnaud... Et des co-internes de talent par milliers ! Merci à vous d'avoir transformé ces longues années d'étude en une grande fête permanente !

Enfin, le temps de l'Amour...

La constante au cours de toutes ces années, c'est toi ma belle. Merci pour ta patience, particulièrement pour accepter jour après jour mes animaux empaillés, moustaches, rouflaquettes, kimono vietnamien et autres excentricités décoratives, capillaires ou vestimentaires.

Toutes ces années avec toi ont été magnifiques et je n'ai aucun doute sur le bonheur que la vie nous réserve pour les années à venir. Où que ce soit et quelles que soient les possibilités, tu resteras l'essence même de mon bien-être.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des principales abréviations.....	3
Table des figures.....	5
Table des tableaux.....	7
Partie 1 : Introduction et généralités	8
1) Etats septiques sévères : sepsis, choc septique	9
1) a) Épidémiologie.....	9
1) b) Définitions	10
2) Sepsis : physiopathologie de la réponse immunitaire	12
2) a) Conceptions générales	12
2) b) Initiation de la réponse immunitaire	15
2) c) Rôle des cytokines et autres médiateurs de l'inflammation.....	16
2) d) Réponse cellulaire adaptative : LT CD4+ helpers et régulateurs	18
2) e) Réponse cellulaire adaptative : lymphocytes T CD8+	24
2) f) Lymphocytes T mémoires	26
2) g) Lymphocytes T : phénotypes, facteurs de transcription et fonctions des principales sous-populations résumés en schémas	27
3) Sepsis : déséquilibre immunosuppresseur	28
3) a) Apoptose et immunosuppression	28
3) b) Impact du sepsis sur les cellules immunitaires	29
3) c) Epuisement lymphocytaire : T cell exhaustion.....	33
4) Objectifs de l'étude	41
Partie 2 : Matériel et méthodes	42
1) Population étudiée.....	43
2) Echantillons biologiques.....	44
3) Cytométrie en flux et notions d'immunophénotypage	44
4) Marquage des échantillons	47
5) Analyse par cytométrie en flux	47
6) Stratégie d'analyse	48
7) Analyse statistique	52
Partie 3 : Résultats.....	53
1) L'augmentation du nombre de lymphocytes T CD4+ au cours du sepsis est de bon pronostic ...	54
2) Les LT effecteurs CD8+ sont augmentés chez les patients qui évoluent péjorativement	56
3) Expression d'immunes checkpoints sur les LT CD8+	59

3) a) Evolution du pourcentage de LT CD8+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 au cours des premiers jours du sepsis.....	59
3) b) Profils d'acquisition des immune checkpoints sur les LT CD8+	60
3) c) Profil no ICP	61
3) d) Profil PD-1+	62
3) e) Profil 2B4+/PD-1+.....	63
3) f) Profil 2B4+/CD160+.....	64
3) g) Comparaison des profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+ vis-à-vis de l'âge, du nombre de lymphocytes, de LT, de Tregs et du rapport CD4+/CD8+	65
4) Expression d'immune checkpoints sur les LT CD4+	67
4) a) Evolution du pourcentage de LT CD4+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 au cours des premiers jours du sepsis.....	67
4) b) Profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+.....	68
4) c) Profil no ICP	69
4) d) Profil PD-1+	70
4) e) Profil 2B4+	71
4) f) Comparaison des profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+ vis-à-vis de l'âge, du nombre de lymphocytes, de LT, de Tregs et du rapport CD4+/CD8+	72
5) Trois profils immunitaires majeurs distinguent les patients en choc septique	73
6) Les profils immunitaires des patients en choc septique corrént avec différents pronostics	75
6) a) L'expression de PD-1 par les LT CD8+ est de mauvais pronostic	75
6) b) L'expression de PD-1 par les LT CD4+ n'a pas d'impact sur le pronostic.....	76
6) c) Le profil immunitaire 2B4/PD1 sur les LT CD8+ et no ICP sur les LT CD4+ est le plus défavorable chez les patients en choc septique	77
Partie 4 : Discussion.....	78
Conclusion	92
Bibliographie :.....	95
Annexes :	104

Liste des principales abréviations

Ag	Antigène
BCR	Récepteur des lymphocytes B
BTLA	B- and T-lymphocyte attenuator (CD272)
CD	Cluster of differentiation
DCs	Cellules dendritiques
CLRs	C-type lectin receptors
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices de l'antigène
CTL	Lymphocytes T CD8+ cytotoxiques
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CD152)
DAMPs	Damage associated molecular patterns
Foxp3	Forkhead box P3
FSC	Forward scatter
GATA-3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor
GITR	Glucocorticoid-induced TNF receptor
GM-CSF	Granulocyte/monocyte colony stimulating factor
HGMB1	HighMobility Group Box 1
HSP	Protéine de choc thermique
ICOS	Costimulatory receptor inducible costimulator
ICPs	Immune checkpoints (récepteurs co-inhibiteurs + récepteurs co-stimulateurs)
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INF	Inteféron
IRF	Interferon regulatory transcription factor
ITIM	Immunoreceptor-based inhibitory motif
LAG-3	Lymphocyte-activation protein 3 (CD233)
LT_{FH}	Lymphocytes T helpers folliculaires
LT_H	Lymphocyte T helper
LT naïf	Lymphocyte T naïf
LPS	Lipopolysaccharide
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells
MFI	Mean Fluorescence Intensity
NF-κB	Nuclear factor-kappa B

NK	Natural killer
NLRs	Nucleotide-binding oligomerization domain–like receptors
NO	Monoxyde d’azote
PAM	Pression artérielle moyenne
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PD-1	Programmed cell death protein 1 (CD279)
PD-L1	Programmed cell death receptor ligand-1
PMT	Photomultiplicateur
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PRR	Pattern recognition receptor
RLRs	Retinoic acid inducible gene 1–like receptors
RORγt	Retinoid Orphan Nuclear Receptor
SI	Système immunitaire
SNC	Système nerveux central
SOFA	Sequential [ex Sepsis related] Organ Failure Assessment
SSC	Side scatter
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TGF	Transforming growth factor
TLRs	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
Tregs	Lymphocytes T régulateurs (nTreg : Tregs naturels/ iTregs : Tregs induits)
Tex	Lymphocytes T épuisés (exhausted)
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
VA	Ventilation assistée

Table des figures

Figure 1 : Estimation d'incidence et de la mortalité liées au sepsis.....	9
Figure 2 : Conception classique des réponses pro et anti-inflammatoires lors du sepsis	13
Figure 3 : Réponse de l'hôte au sepsis	14
Figure 4 : Propriétés générales des cytokines.....	17
Figure 5 : Principales populations de lymphocytes T helpers et régulateurs	18
Figure 6 : Régulation des réponses T _H 1 et T _H 2 via les cytokines sécrétées.....	20
Figure 7 : Développement thymique et périphérique des Tregs Foxp3+.....	21
Figure 8 : Mécanismes conduisant aux fonctions immunosuppressives des Tregs	22
Figure 9 : Activation schématisée des LTCD8+	25
Figure 10 : Evolution du nombre du taux de LT mémoires et de la susceptibilité à un pathogène au cours de la vie.....	26
Figure 11 : Impact du sepsis sur les cellules du système immunitaire inné et adaptatif.....	31
Figure 12 : Développement progressif de l'épuisement lymphocytaire lié au contact prolongé avec un antigène.....	34
Figure 13 : Développement de l'épuisement lymphocytaire	35
Figure 14 : Molécules régulatrices et leurs ligands	36
Figure 15 : Profil d'expression des immune checkpoints au cours d'une infection.....	37
Figure 16 : Mécanismes moléculaires induits par les récepteurs co-inhibiteurs et conduisant à l'épuisement lymphocytaire.....	39
Figure 17 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux	45
Figure 18 : Identification des lymphocytes T en CMF	48
Figure 19 : Etude des Tregs en CMF	49
Figure 20 : Profil d'expression de marqueurs d'immune checkpoints en CMF sur les LT CD8+	50
Figure 21 : Différentiation phénotypique entre les LT naïfs/mémoires latents et les LT effecteurs	51
Figure 22 : Evolution du nombre (valeur absolue) de lymphocytes totaux, de LT CD4+ et CD8+ et des Tregs au cours des premiers jours du sepsis.....	54
Figure 23 : LT effecteurs : exemple d'histogramme 1.....	56
Figure 24 : LT effecteurs : exemple d'histogramme 2.....	57
Figure 25 : LT effecteurs : exemple d'histogramme 3.....	57
Figure 26 : Evolution du pourcentage de LT effecteurs CD4+ et CD8+ au cours des premiers jours du sepsis	58
Figure 27 : Evolution du pourcentage de LT CD8+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 au cours des premiers jours du sepsis.....	59

Figure 28 : Profils d'acquisition des immune checkpoints sur les LT CD8+	60
Figure 29 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD8+ n'exprimant aucun des ICPs étudiés : profil no ICP	61
Figure 30 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD8+ majoritairement sans ICP.	61
Figure 31 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD8+ exprimant prioritairement PD-1 : profil PD-1+	62
Figure 32 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD8+ prioritairement PD-1+	62
Figure 33 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD8+ exprimant d'abord 2B4 puis PD-1 : profil 2B4+/PD-1+	63
Figure 34 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD8+ majoritairement 2B4+/PD- 1+	63
Figure 35 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD8+ exprimant d'abord 2B4 puis CD160: profil 2B4+/CD160+	64
Figure 36 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD8+ majoritairement 2B4+/CD160+	64
Figure 37 : Comparaison des profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+ vis-à-vis de l'âge, du nombre de lymphocytes, de LT, de Tregs et du rapport CD4+/CD8+	65
Figure 38 : Evolution du pourcentage de LT CD4+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 au cours des premiers jours du sepsis	67
Figure 39 : Profils d'acquisition des immune checkpoints sur les LT CD4+	68
Figure 40 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD4+ n'exprimant aucun des ICPs étudiés : profil no ICP	69
Figure 41 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD4+ majoritairement sans ICP.	69
Figure 42 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD4+ exprimant prioritairement PD-1 : profil PD-1+	70
Figure 43 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD4+ prioritairement PD-1+	70
Figure 44 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD4+ exprimant prioritairement 2B4 : profil 2B4+	71
Figure 45 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD4+ prioritairement 2B4+	71
Figure 46 : Comparaison des profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+ vis-à-vis de l'âge, du nombre de lymphocytes, de LT, de Tregs et du rapport CD4+/CD8+	72
Figure 47 : Comparaison des 3 profils majoritaires d'acquisition d'ICPs sur les CD4+ et CD8+ vis-à-vis du nombre de CD4+ / μ L et de Tregs / μ L	74
Figure 48 : Courbes de survie en fonctions des principaux profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+	75

Figure 49 : Courbes de survie en fonctions des principaux profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+	76
Figure 50 : Courbes de survie en fonctions des 3 principaux profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+ et CD4+	77

Table des tableaux

Tableau 1 : Score SOFA.....	10
Tableau 2 : Quick SOFA.....	11
Tableau 3 : Critères identifiant le choc septique.....	11
Tableau 4 : Les PRRs, leurs localisations et leurs ligands	15
Tableau 5 : Survie à J28 et J90 post-sepsis des patients inclus dans l'étude	43
Tableau 6 : Principaux marqueurs cellulaires utilisés dans l'étude, cellules d'expression, fonctions ..	46
Tableau 7 : Tableau descriptif des combinaisons d'anticorps ciblant les marqueurs membranaires ..	47
Tableau 8 : Comparaison des profils majoritaires d'acquisition d'ICPs selon le nombre de patients ..	73
Tableau 9 : Comparaison des profils majoritaires d'acquisition d'ICPs selon la survie.....	73
Tableau 10 : Tableau comparatif de différents travaux observant les profils immunitaires au cours du sepsis	90

Partie 1 : Introduction et généralités

1) Etats septiques sévères : sepsis, choc septique

1) a) Épidémiologie

Les états septiques graves (sepsis et choc septique) représentent un problème majeur de santé publique, touchant des millions de personnes dans le monde et responsables de la mort du patient dans plus d'un tiers des cas (1).

Même si l'incidence mondiale réelle est inconnue du fait d'un manque de données, notamment dans les pays en voie de développement, plusieurs tentatives d'estimation ou d'extrapolation placent les états septiques parmi l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. A titre d'exemple, Adhikari et al. (2) estimaient en 2010 l'incidence mondiale du sepsis entre 15 et 19 millions de cas par an. En 2016, Fleischmann et al. (3) l'estimaient à environ 31,5 millions de cas par an dont environ 19,4 millions de cas de sepsis sévère (anciennes définitions) et avec potentiellement 5,3 millions de décès annuels.

De récentes études épidémiologiques menées en France (4)(5), aux Etats-Unis (6) en Australie et en Nouvelle-Zélande (7)(8) s'accordent à dire que les états septiques graves représentent l'une des principales causes d'hospitalisation en service de réanimation et de soins intensifs. Ces différentes études se rejoignent aussi sur le fait que, grâce à une amélioration de leur prise en charge, la mortalité globale semble avoir diminué au cours des dernières décennies (pour des taux allant de 18% à 42% en fonction des études).

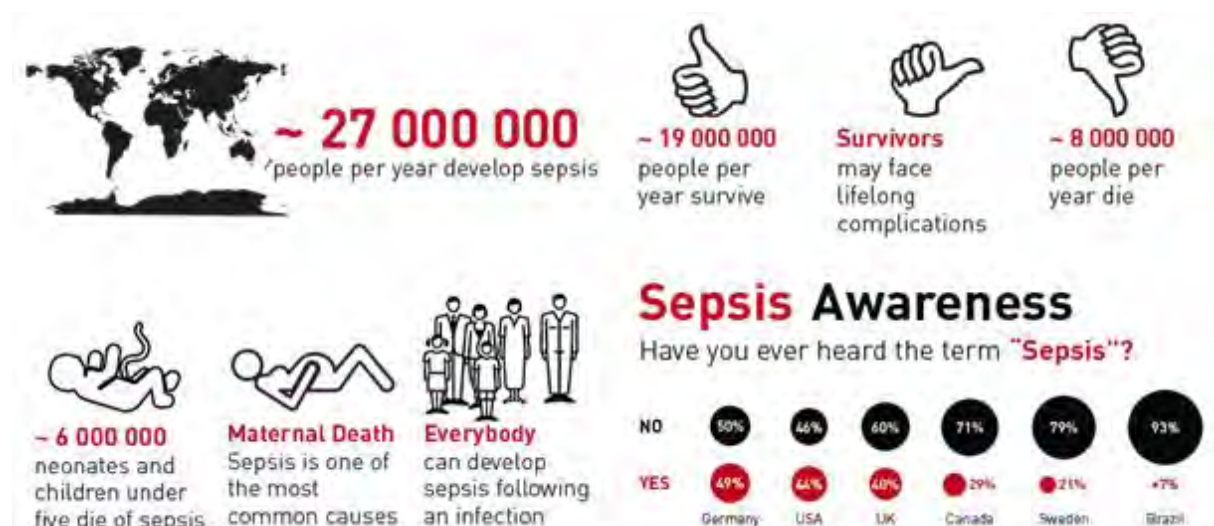


Figure 1 : Estimation d'incidence et de la mortalité liées au sepsis
www.global-sepsis-alliance.org (1)(9)

Malgré les progrès thérapeutiques, en particulier dans le traitement de la phase aiguë, le pronostic reste entravé par une mortalité à long terme élevée due notamment à des infections nosocomiales secondaires, des réactivations virales, un risque accru d'événements cardiovasculaires, une persistance de dysfonctions d'organes et des réadmissions hospitalières fréquentes entraînant, par ailleurs, des coûts de santé accrus (10)(11)(12)(13).

1) b) Définitions

Le sepsis

Le sepsis est défini, selon les recommandations du groupe sepsis-3 de 2016 (14), comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causé par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection.

Il existe divers systèmes de score permettant de classer la sévérité des dysfonctions d'organe. Leur utilisation a conduit à une disparité dans la prise en charge du patient. Le système majoritairement utilisé dans le monde, et donc le plus représentatif, semble être le score SOFA (Sequential [ex Sepsis related] Organ Failure Assessment). Les dysfonctions d'organes peuvent être identifiées par une augmentation rapide du score SOFA ≥ 2 points à la suite de l'infection (Tableau 1). Un score SOFA ≥ 2 entraîne un risque de mortalité accru de 10 % par rapport à une population générale de patients hospitalisés avec une suspicion d'infection ; ce qui justifie une prise en charge adaptée et rapide (14).

Calcul score SOFA	0 points	1 point	2 points	3 points	4 points
Respiration PaO ₂ / FiO ₂	> 400	301 à 400	201 à 300	101 à 200	≤ 100 et VA
Coagulation Plaquettes (G/L)	> 150	101 à 150	51 à 101	21 à 50	≤ 20
Foie Bilirubine (mg/L) (mmol/L)	< 12 < 20	12 - 19 20 - 32	20 - 59 33 - 101	60 - 119 102 - 204	> 120 > 204
Cardio-vasculaire Hypotension	PAM ≥ 70mmHG	PAM < 70mmHG	Dopamine ≤ 5 ou dobutamine (toute dose)	dopa > 5 ou adrénaline ≤ 0,1 ou noradré ≤ 0,1	dopa > 15 ou adrénaline > 0,1 ou noradré > 0,1
SNC Score de Glasgow	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Rein Créatinine (mg/L) (μmol/L) ou diurèse	< 12 < 110	12 - 19 110 - 170	20 - 34 171 - 299	35 - 49 300 - 440 < 500 mL/j	> 50 > 440 < 200 mL/j

VA : ventilation assistée. PAM : pression artérielle moyenne [estimée par (PAS + 2 x PAD) / 3]. Amines : dose en μg/kg/min

Tableau 1 : Score SOFA

Le SOFA basal est supposé être à zéro en l'absence de dysfonction d'organe, aiguë ou chronique, préexistante. Adapté de Vincent et al. (15)

Des critères simplifiés, le quick SOFA (qSOFA), ont aussi été proposés pour le dépistage de patients susceptibles d’avoir un sepsis et pour les services hors réanimation (Tableau 2).

Critères du Quick SOFA (qSOFA)
Pression artérielle systolique ≤ 100 mmHg
Fréquence respiratoire ≥ 22 /min
Confusion

Tableau 2 : Quick SOFA

Score SOFA simplifié : la présence d’au moins 2 critères identifie des patients de mauvais pronostic justifiant une surveillance accrue et/ou un traitement spécifique et/ou la prise d’un avis en réanimation (14).

Le choc septique

Le sepsis sévère n’est plus reconnu dans les définitions du groupe d’étude sepsis-3 de 2016.

Le choc septique est défini comme un sous-groupe du sepsis associé à des anomalies importantes circulatoires et métaboliques entraînant une mortalité accrue (environ 40%) (14). Il est identifié par l’association de plusieurs critères (Tableau 3).

Critères du choc septique
Sepsis
Besoin de drogues vasopressives pour maintenir une PAM ≥ 65 mmHg
Lactates > 2 mmol/l (18mg/dl) malgré un remplissage adéquat

Tableau 3 : Critères identifiant le choc septique.

D’après sepsis-3 (14)

2) Sepsis : physiopathologie de la réponse immunitaire

2) a) Conceptions générales

Le sepsis est défini comme une réponse immunitaire inappropriée de l'hôte à une infection.

On constate une diversité considérable dans la réponse inflammatoire et immunitaire à une infection en relation avec des facteurs liés à l'hôte (âge, co-morbidités, facteurs génétiques et environnementaux) et des facteurs liés au pathogène (charge, virulence, PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns) (16). La composante de la réponse de l'hôte varie probablement aussi au cours du temps parallèlement à l'évolution clinique.

Conception classique

Dans la conception classique de la physiopathologie du sepsis, la mortalité précoce liée au choc et aux défaillances d'organes est principalement la conséquence d'une libération massive de cytokines pro-inflammatoires entraînant une exacerbation inappropriée de la réponse inflammatoire (17)(18). Grâce à une amélioration de la prise en charge initiale, la plupart des patients survivent désormais à cet état initial (19). Cependant, des complications et une mortalité plus tardive, souvent à rattacher à des états infectieux (aggravation de l'infection initiale, apparition d'infections secondaires/nosocomiales ou réactivations virales), font suggérer une altération profonde des défenses immunitaires de l'hôte.

En général, on considère que la réaction pro-inflammatoire innée, ayant pour but d'éradiquer le pathogène, est responsable de dommages tissulaires et de défaillances d'organe précoces. La réponse anti-inflammatoire (innée et adaptative), est quant à elle essentielle pour contenir une inflammation excessive et limiter les lésions tissulaires locales et systémiques mais peut être impliquée dans la sensibilité accrue aux infections secondaires (Figure 2 et 3).

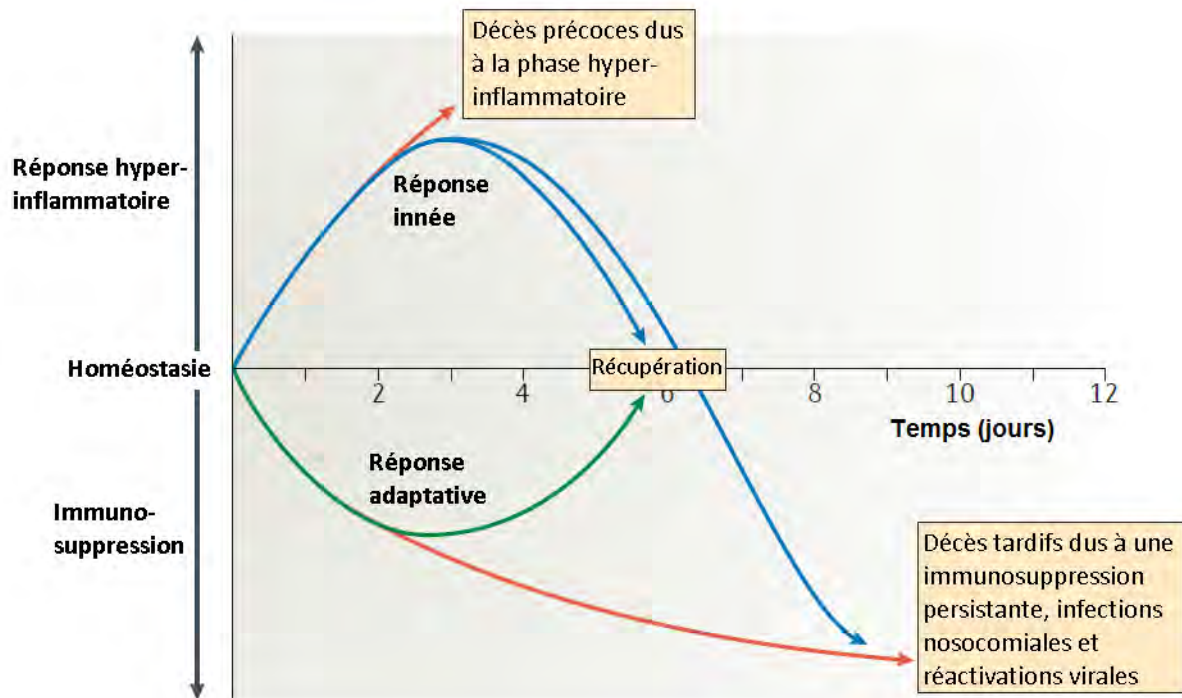


Figure 2 : Conception classique des réponses pro et anti-inflammatoires lors du sepsis

Des réponses pro et anti-inflammatoire se mettent rapidement en place après le début du sepsis.

Les cellules composant le système immunitaire inné (SI) comme les polynucléaires neutrophiles (PNN), les monocytes et les cellules dendritiques (DCs) libèrent rapidement de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (ligne bleue : jour 0 à 3). Les morts précoces liées au sepsis (flèche rouge en haut du schéma, jour 3) sont dus à cet "orage cytokinique" et à la réponse hyper-inflammatoire qui entraîne une fièvre, un choc, une acidose et un hyper-catabolisme.

La plupart des patients survivent à l'infection initiale grâce à un retour à des réponses immunitaires innées et adaptatives appropriées (homéostasie) (lignes bleues et vertes, J6).

Lorsque le sepsis persiste, on peut parfois observer un échec de la régulation des réponses innées et adaptatives conduisant à une immunosuppression profonde. Cet état est à risque d'aggravation de l'infection primaire, d'apparition d'infections nosocomiales secondaires et/ou de réactivations virales responsables de décès plus tardifs (lignes bleues et rouges, après J6). Traduit et adapté de Hotchkiss et al. (18)

Conception alternative

Une hypothèse plus controversée veut que la meilleure façon de décrire la réponse immunitaire lors du sepsis soit de considérer qu'il existe une inflammation prolongée, entraînée par le système immunitaire (SI) inné. C'est ce mécanisme qui serait responsable des lésions tissulaires et des dysfonctions d'organe. Selon cette théorie, l'inflammation liée au système immunitaire inné persiste malgré la régulation négative de la réponse immunitaire adaptative et c'est cette inflammation qui est finalement responsable de la morbidité et de la mortalité tardive des patients (20).

Il est probable que des zones de tissu nécrotiques et ischémiques contribuent à la persistance d'une inflammation locale participant ainsi au dysfonctionnement organique et à la morbi-mortalité chez certains patients, pouvant rendre cette théorie en partie compatible avec la conception plus classique de la réponse immunitaire au sepsis (18).

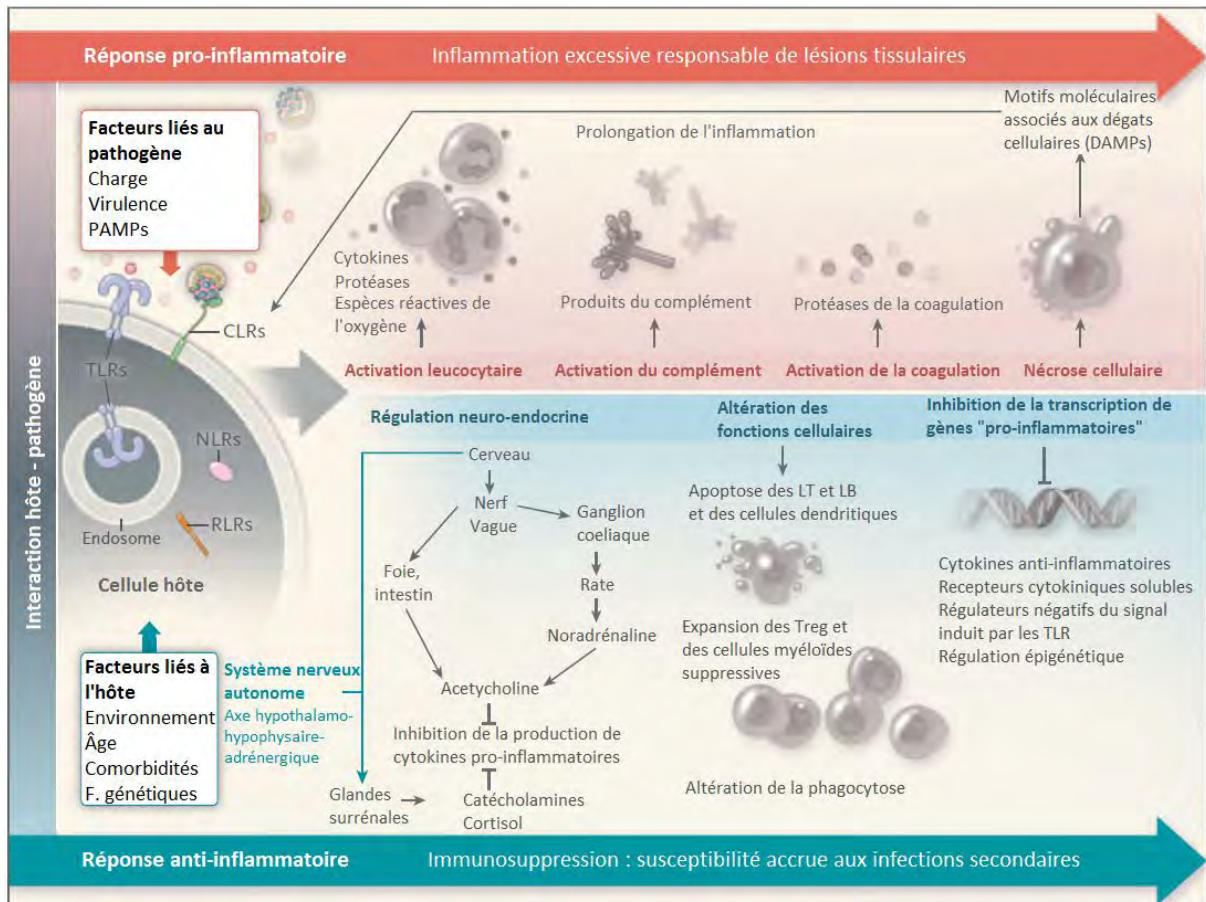


Figure 3 : Réponse de l'hôte au sepsis

Lors du sepsis, l'hôte développe à la fois une réponse inflammatoire excessive (**en rouge**) et, pour contrôler celle-ci, une réponse anti-inflammatoire et immunosuppressive (**en bleu**).

La réponse inflammatoire est initiée par l'interaction entre les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes, et les PRR (Pattern Recognition Receptors) récepteurs membranaires des cellules de l'immunité innée.

L'exacerbation de l'inflammation entraîne des lésions tissulaires et une nécrose cellulaire libérant des DAMPs (Damage-associated molecular patterns : protéines de choc thermique (HSP), High Mobility Group Box 1 (HGMB1), β -défensines). Ces motifs moléculaires résultant des dégâts cellulaires, ont pour conséquence la prolongation de l'inflammation en se liant à des PRRs.

Pour contrebalancer cette inflammation excessive une réponse anti-inflammatoire se met en marche rapidement. Lors d'un contact prolongé avec l'antigène, celle-ci peut conduire à une immunosuppression parfois profonde et persistante responsable d'une mortalité tardive accrue.

Traduit et adapté du travail de Angus et al. (21)

Les différentes théories se rejoignent sur le fait que les états septiques déclenchent une réponse de l'hôte, complexe, variable et prolongée. D'une part, les mécanismes pro-inflammatoires peuvent contribuer de façon bénéfique à la clairance de l'infection et de façon délétère à l'apparition de lésions organiques. D'autre part, les mécanismes anti-inflammatoires inflammatoires peuvent contribuer de façon bénéfique à la réparation des tissus et de façon délétère à l'aggravation de l'infection initiale et à la survenue d'infections secondaires (Figure 3).

2) b) Initiation de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire et inflammatoire à une infection est initiée lors de l'interaction entre les motifs moléculaires caractéristiques du pathogène en cause et les récepteurs cellulaires de l'hôte. Le SI inné joue un rôle fondamental lors de l'inflammation aiguë liée au sepsis en étant responsable de la reconnaissance et de la clairance phagocytaire précoce du pathogène, en permettant l'initiation de la réponse secondaire adaptative mais aussi en prenant part au développement des mécanismes conduisant aux lésions tissulaires. Les cellules du SI inné, comme les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (DCs), ainsi que des cellules non-professionnelles, comme les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes, sont décisives lors du contact avec le micro-organisme. Elles expriment des récepteurs (PRRs : Pattern Recognition Receptors) reconnaissant des structures moléculaires conservées parmi les différents micro-organismes appelées PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Les PRRs permettent aussi la reconnaissance de motifs moléculaires endogènes ou signaux de danger (DAMPs : damage associated molecular patterns) dont la libération résulte de dégâts cellulaires et qui peuvent ainsi provoquer une pérennisation de l'inflammation (21)(22).

PRRs	Localization	Ligand	Origin of the Ligand
TLR			
TLR1	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	Bacteria
TLR2	Plasma membrane	Lipoprotein	Bacteria, viruses, parasites, self
TLR3	Endolysosome	dsRNA	Virus
TLR4	Plasma membrane	LPS	Bacteria, viruses, self
TLR5	Plasma membrane	Flagellin	Bacteria
TLR6	Plasma membrane	Diacyl lipoprotein	Bacteria, viruses
TLR7 (human TLR8)	Endolysosome	ssRNA	Virus, bacteria, self
TLR9	Endolysosome	CpG-DNA	Virus, bacteria, protozoa, self
TLR10	Endolysosome	Unknown	Unknown
TLR11	Plasma membrane	Profilin-like molecule	Protozoa
RLR			
RIG-I	Cytoplasm	Short dsRNA, 5' triphosphate dsRNA	RNA viruses, DNA virus
MDA5	Cytoplasm	Long dsRNA	RNA viruses (Picornaviridae)
LGP2	Cytoplasm	Unknown	RNA viruses
NLR			
NOD1	Cytoplasm	iE-DAP	Bacteria
NOD2	Cytoplasm	MDP	Bacteria
CLR			
Dectin-1	Plasma membrane	β -Glucan	Fungi
Dectin-2	Plasma membrane	β -Glucan	Fungi
MINCLE	Plasma membrane	SAP130	Self, fungi

Tableau 4 : Les PRRs, leurs localisations et leurs ligands

Toll-like receptors (TLRs) / C-type lectin receptors (CLRs) / retinoic acid inducible gene 1-like receptors (RLRs) / nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs). Takeuchi O. et Akira S. (22)

Quatre principales familles de PRRs ont actuellement été identifiées (Tableau 4). Leurs localisations et leurs spécificités vis-à-vis d'un ligand et donc d'un pathogène sont variables d'une famille à une autre et d'un type de récepteur à un autre.

L'interaction entre les PAMPs, les DAMPs et les différents PRRs va entraîner des réactions intracellulaires en cascade, responsables de l'expression ou de l'inhibition de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et l'immunité. En fonction de la nature du pathogène et du type de PRR avec lequel celui-ci va interagir, les voies de signalisation intracellulaire peuvent varier et induire la régulation de différents gènes de l'inflammation entraînant ainsi des profils de réponse variés.

La cascade de phosphorylation peut entraîner le recrutement de facteurs de transcriptions (NF- κ B : nuclear factor-kappa B ou IRF : interferon regulatory transcription factor) dont la translocation intranucléaire va permettre une augmentation de l'expression de gènes codant pour des cytokines ou autres médiateurs de l'inflammation (22).

2) c) Rôle des cytokines et autres médiateurs de l'inflammation

Les cellules de l'immunité innée présentes dans les tissus infectés, telles que les monocytes/macrophages (cellules phagocytaires), sont les premières cellules activées et sont responsables de la libération précoce et massive de médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines (interleukines, chimiokines, facteurs de croissance) et autres composés actifs. Les mastocytes présents dans les tissus, lors du contact avec le pathogène vont aussi initialement libérer de l'histamine, permettant une augmentation de la perméabilité vasculaire et une vasodilatation indispensables à l'initiation de l'inflammation locale. Les lymphocytes T (LT), en particulier les T_H (T helpers ou T auxiliaires) seront aussi parmi les principales cellules productrices de cytokines mais de façon un peu plus tardive car ils nécessitent une présentation de l'antigène par les CPA (cellules présentatrices de l'antigène comme les macrophages et DCs) et des signaux de co-stimulation.

Les cytokines représentent un groupe diversifié de petites protéines ou glycoprotéines impliquées dans la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Elles permettent la communication entre les cellules immunitaires en régulant leur activation, leur prolifération, leur différenciation et leur migration en fonction de la nature du signal détecté. Elles sont aussi capables de réguler la sécrétion d'autres cytokines ou d'anticorps, de moduler l'expression de divers récepteurs membranaires (dont les récepteurs aux cytokines ou aux chimiokines) et peuvent également provoquer la mort programmée par apoptose d'une cellule cible (23).

Le monde des cytokines est constitué tant par des facteurs solubles que par leurs récepteurs et l'activité d'une cytokine vis-à-vis d'une cellule cible va dépendre de la représentation qualitative et quantitative en son récepteur à la surface de la cellule. Cette représentation cellulaire est modifiée en permanence rendant le profil d'expression éphémère. Les récepteurs sont multiples et non exclusifs (ils peuvent fixer différentes cytokines). En outre, l'activation d'un même récepteur peut engager des voies de signalisation intracellulaire différentes et par ce biais entraîner l'expression ou l'inhibition de divers gènes impliqués dans l'inflammation et ainsi provoquer des réponses variées.

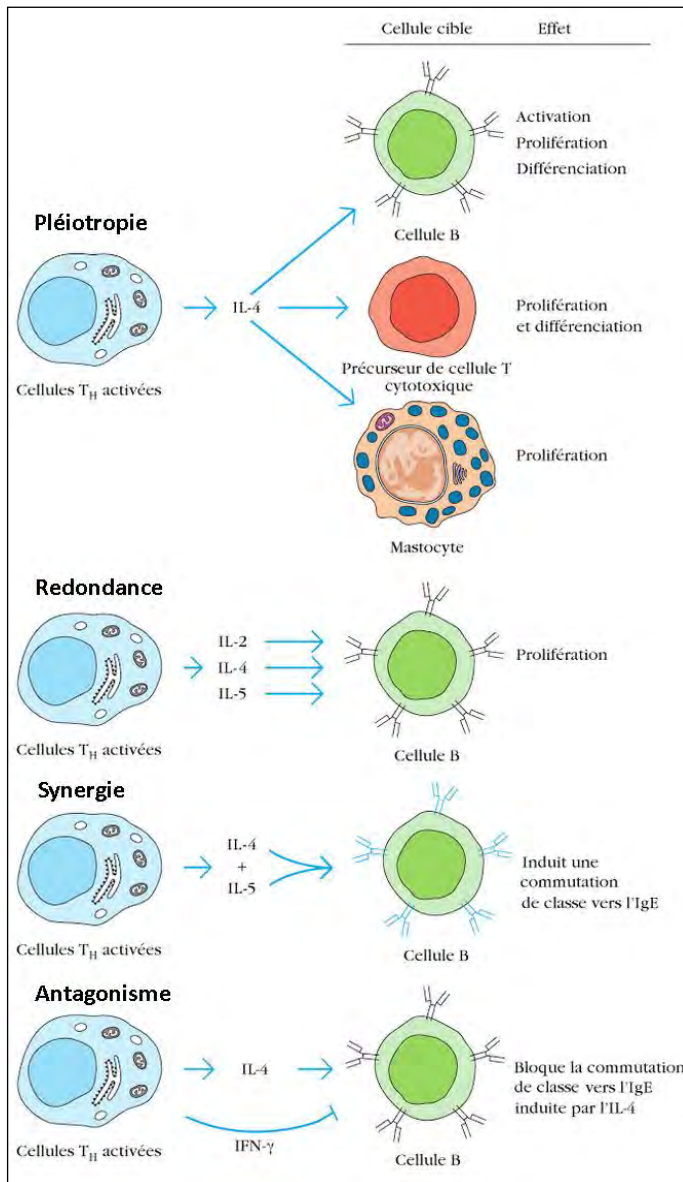


Figure 4 : Propriétés générales des cytokines
Pléiotropie, redondance, synergie, antagonisme.
Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby (23)

Une même cytokine peut ainsi recruter plusieurs voies de signalisation différentes; elle peut aussi avoir de multiples cibles et se fixer sur différents récepteurs. Elle est par conséquent capable de présenter diverses actions sur différents types cellulaires, ce qui définit sa nature pléiotrope.

Différentes cytokines peuvent également se fixer sur un même récepteur et déboucher sur la même fonction, cette redondance va permettre de limiter le risque de défaillance. In vivo les cytokines n'agissent pas isolément mais plutôt au sein d'un « nuage » de cytokines au milieu duquel certaines peuvent interagir entre elles et présenter des effets synergiques ou antagonistes modulant ainsi la réponse (Figure 4).

L'action de cytokines sur une ou plusieurs cellules cibles peut entraîner la libération d'autres cytokines, induisant ainsi une cascade de signaux cellulaires tout en formant un réseau de cytokines autour de ces cellules immunitaires (Annexe 1) (23).

Au cours des états septiques, la réponse cytokinique, précocement initiée par les cellules de l'immunité innée, constitue un réseau très complexe orchestrant la réponse cellulaire innée et adaptative en fonction du pathogène déclenchant. Le monde des cytokines est représenté par une innombrable variété de médiateurs solubles, de récepteurs et de voies de signalisation intracellulaire conduisant à une grande diversité de réponses. A titre d'illustration sont présentées dans un tableau (Annexe 2) quelques cytokines d'intérêt lors de la réponse au sepsis, ainsi que leurs principales origines et fonctions.

2) d) Réponse cellulaire adaptative : LT CD4+ helpers et régulateurs

Les cytokines sont capables d'orienter la réponse lymphocytaire. Les LT helpers ou auxiliaires (LT_H ou T_H) peuvent être classés en plusieurs sous-populations, chacune étant responsable du maintien d'un ensemble de fonctions immunitaires. Ils n'agissent pas directement contre l'agent pathogène mais indirectement en orchestrant l'action des cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative. Les lymphocytes T_{H1} et T_{H2} ont été les premières sous populations à être identifiées (24). Les LT_{H17} et les LT régulateurs (Tregs) ont été plus récemment décrites ainsi que d'autres sous populations qui ne seront pas toutes développées dans ce travail.

Les différentes sous-populations proviennent de la différenciation antigène-dépendante de lymphocytes T naïfs (LT naïfs) orientée par des signaux de co-stimulation et par un nuage cytokinique produit par les cellules de l'immunité suite à l'interaction avec un pathogène. Chacune de ces sous-populations est capable de produire un panel cytokinique particulier. La différenciation et l'activation de chaque sous-population T est maintenue grâce à différentes combinaisons de cytokines (Figure 5).

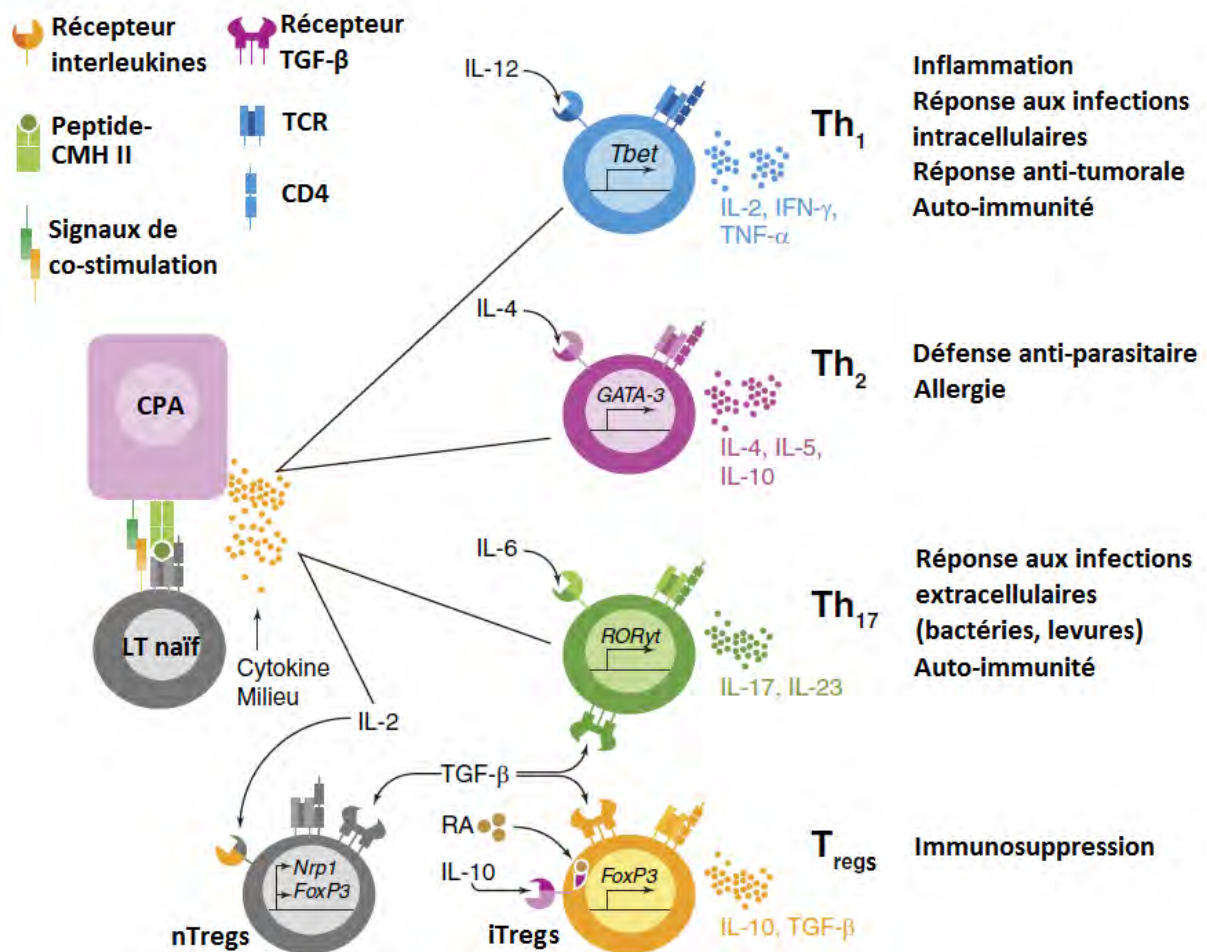


Figure 5 : Principales populations de lymphocytes T helpers et régulateurs

Il existe de nombreuses populations lymphocytaires auxiliaires dont la majorité est CD4+. Chacune présente des particularités d'origine, de phénotype et de fonctions, non-exclusives qui permettent une réponse cellulaire complexe et adaptée au type de pathogène en cause. Cabrera-Perez et al. (2014) (59)

Lymphocytes T_H1

La différenciation T_H1 est initiée au moment de la présentation par les CPA d'antigènes du non-soi. Parallèlement à la présentation de l'Ag les CPA activées sécrètent des cytokines et notamment de l'IL-12 qui activent les NK producteurs d'IFN- γ . L'IFN- γ est la cytokine clé de la polarisation vers la réponse T_H1. La signalisation intracellulaire induite par la fixation de l'IFN- γ sur son récepteur conduit alors à l'activation par STAT-1 du facteur de transcription T-bet. Ce dernier régule la transformation du récepteur à l'IL-12 de faible affinité initialement présent sur le LT naïf en récepteur de forte affinité. L'action de l'IL-12 sur le LT naïf est alors potentialisée et va conduire au recrutement de STAT-4 qui renforce l'expression de T-bet. Ce dernier régule la sécrétion d'IFN- γ , et l'acquisition par le LT_H1 de ses fonctions effectrices.

Les lymphocytes T_H1 ainsi différenciés auront un profil de sécrétion cytokinique particulier : IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- α .

Ce profil T_H1 oriente la réponse immunitaire vers un rôle pro-inflammatoire, une activation macrophagique et une toxicité cellulaire spécifique médiée par les LT CD8+ cytotoxiques indispensable dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires (Figure 5). (25)(26)

Lymphocytes T_H2

Parallèlement à l'internalisation et à la présentation de l'antigène au LT naïf, les CPA activés produisent aussi de l'IL-4 qui polarise la réponse lymphocytaire vers un profil T_H2. La fixation de l'IL-4 à son récepteur membranaire sur le LT naïf, permet le recrutement intracellulaire de STAT-6 et l'activation du facteur de transcription GATA-3. Cette activation a pour conséquence une inhibition de la transformation du récepteur de l'IL-12 en récepteur de haute affinité et donc une inhibition de la différenciation en LT_H1. Simultanément, l'activation de GATA-3 entraîne une sécrétion accrue d'IL-4 qui permet, de manière autocrine, la différenciation vers un profil T_H2.

Le profil de sécrétion particulier aux LT_H2 inclue notamment l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-25.

La réponse immunitaire T_H2 est impliquée dans l'activation cellulaire B (commutation IgG1, IgE) et la réponse humorale et joue ainsi un rôle particulier dans la défense antiparasitaire et l'allergie (Figure 5). (25)(26)

Chaque sous-population lymphocytaire CD4+ potentialise son développement en inhibant celui de l'autre grâce à l'action de cytokines (Figure 6).

Lymphocytes T_H17

La réponse T_H17 est de découverte plus récente. Les CPA après contact avec le pathogène vont aussi sécréter de l'IL-23, du TGF- β et de l'IL-6 qui, en se fixant sur leurs récepteurs à la surface du LT naïf, vont permettre le recrutement intracellulaire de STAT-3 qui induit le facteur de transcription ROR γ t

(Retinoid Orphan Nuclear Receptor). L'activation de ce facteur de transcription a pour conséquence l'inhibition de la transformation du récepteur à l'IL-12 en récepteur de haute affinité (inhibition de la différenciation en LT_{H1}) et une transformation du récepteur à l'IL-23 en récepteur de haute affinité.

Le profil de sécrétion cytokinique particulier aux LT_{H17} comprend l'IL-17 (A et F), l'IL-22, le TNF- α et le GM-CS.

Les fonctions effectrices T_{H17} consistent principalement en une action pro-inflammatoire via la sécrétion de cytokines et un rôle de défense anti-infectieuse à travers le recrutement et l'activation de la lignée neutrophile et des macrophages au niveau du site infectieux, favorisant la formation d'abcès. La réponse T_{H17} est aussi impliquée dans le développement de l'auto-immunité (Figure 5).

(27)(28)(29)

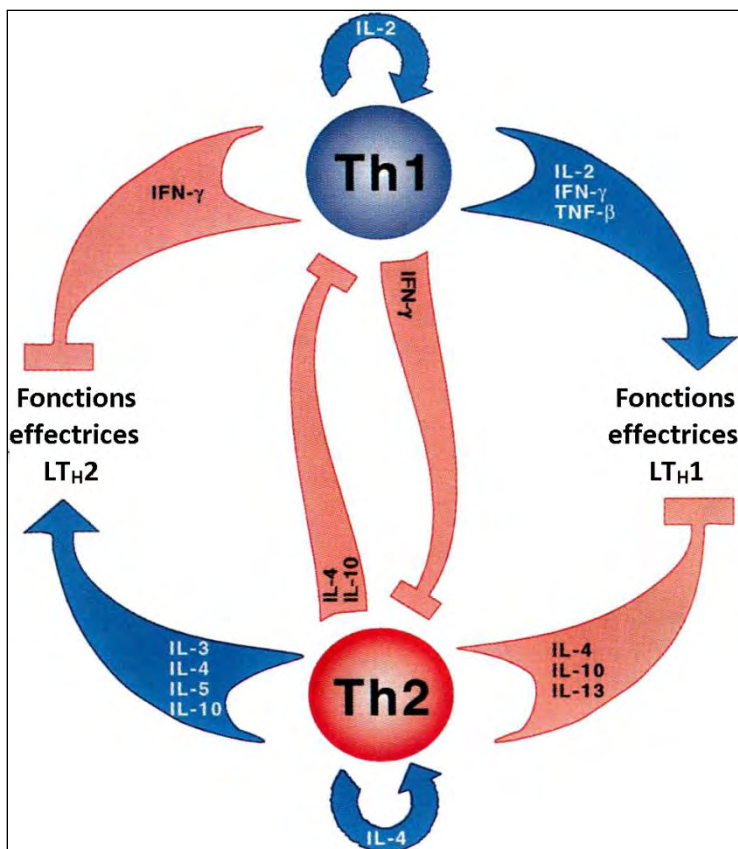


Figure 6 : Régulation des réponses T_{H1} et T_{H2} via les cytokines sécrétées

Les profils de sécrétion cytokinique diffèrent entre les LT_{H1} et LT_{H2} . Chacune de ces populations va être responsable de la sécrétion de cytokines pouvant avoir un rôle effecteur (bleu) ou inhibiteur (rouge) des fonctions effectrices T_{H1} et T_{H2} .

L'IL-2 et l'IL-4 ont un rôle de facteur de croissance actif de manière autocrine pour les lymphocytes T_{H1} et T_{H2} , respectivement.

Abbas et al. (25)

Lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Les lymphocytes T régulateurs ont un rôle d'immuno-modulation et de maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Ils participent à la tolérance périphérique aux antigènes du soi et préviennent ainsi les maladies inflammatoires et auto-immunes. Ils permettent aussi de limiter l'inflammation induite par des pathogènes ou par un trauma.

Différenciation

On distingue les lymphocytes T régulateurs naturels (nTregs) produits dans le thymus, et les lymphocytes T régulateurs induits ou adaptatifs (iTregs) produits en périphérie.

Le processus du développement thymique des nTregs est peu connu. Cependant, il pourrait reposer sur la sélection de lymphocytes T dont le TCR a une forte affinité d'interaction avec des complexes CMH-peptides du soi présentés par les cellules thymiques stromales (30). On ignore toutefois comment les nTregs échappent à la sélection négative de rigueur lors du développement thymique. Il semblerait que le micro-environnement thymique favorise l'expression du facteur de transcription Foxp3 (forkhead box P3) principal régulateur de la fonction suppressive des nTregs (CD4+ CD25+ Foxp3+) (31).

En plus de la tolérance centrale naturelle dans le thymus il existe une tolérance périphérique induite notamment au niveau des organes lymphoïdes secondaires, aboutissant au développement des iTreg. La stimulation du LT naïf (CD25-) en présence notamment de TGF- β et d'IL-2 conduit à l'activation intracellulaire, via STAT-3, du facteur de transcription Foxp3 (32). L'activation de Foxp3 entraîne une forte expression membranaire du CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) et conduit à une diminution de la sécrétion d'IL-2 par les Tregs qui seront dépendants de teneur en IL-2 du microenvironnement pour proliférer. La signalisation induite par l'IL-2 active STAT-5 qui coopère avec STAT-3 pour induire Foxp3 (32). Les nTregs et les iTregs constituent ainsi la population des Tregs CD25+ Foxp3+ circulants (Figure 7) et sont phénotypiquement indifférenciables (33).

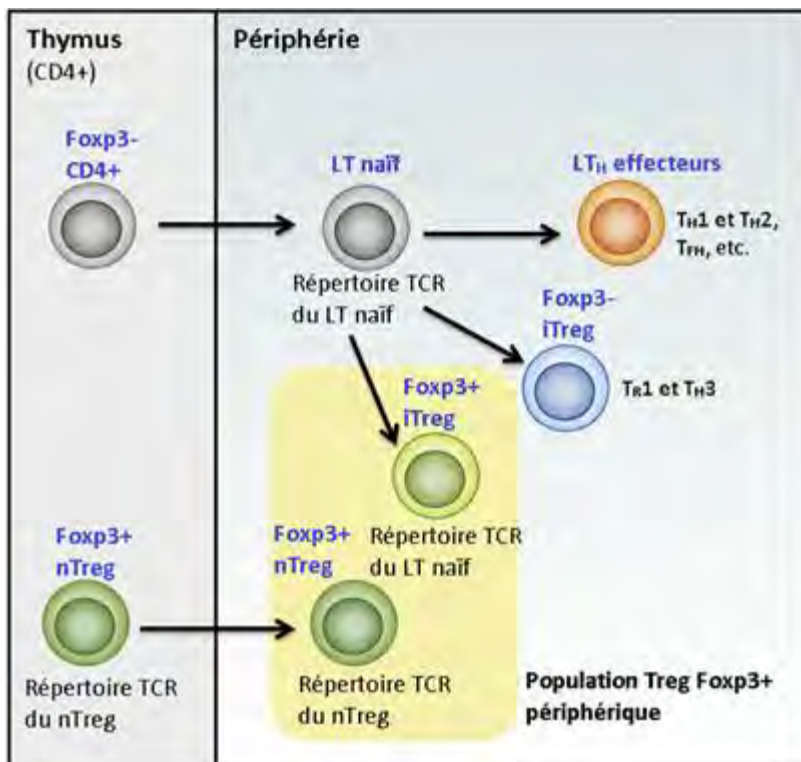


Figure 7 : Développement thymique et périphérique des Tregs Foxp3+

La population périphérique des Tregs Foxp3+ est composée de nTregs et de iTregs.

Les nTregs se développent dans le thymus puis migrent en périphérie.

Les iTregs se développent au sein des organes lymphoïdes secondaires à partir de LT CD4+ naïfs et ont donc un répertoire TCR différent des nTregs. (33)

Phénotype

Foxp3 représente un bon marqueur phénotypique des Tregs même s'il peut être exprimé transitoirement par des lymphocytes activés sans pour autant acquérir de fonctions immunosuppressives (34). Le profil phénotypique des Tregs peut être complété par une expression faible du CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL-7), et une forte expression du CD25 (35). Les Tregs semblent exprimer fréquemment des récepteurs co-inhibiteurs (régulateurs négatifs) comme le CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), analogue du CD28, transmettant un signal inhibiteur lors de l'interaction avec le complexe B7 (CD80-CD86) à la surface des CPA (36). D'autres molécules régulatrices comme PD-1 (CD279 = Programmed cell death protein 1) (37)(38), GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor) (39) ou ICOS (costimulatory receptor inducible costimulator) (40) semblent aussi pouvoir être exprimées et joueraient un rôle dans la régulation immunitaire.

Fonctions

Avec l'expression de Foxp3, le Treg acquiert ses fonctions suppressives (31). De fait, des mutations sur le gène codant pour Foxp3 sont responsables chez l'homme d'un syndrome d'immuno-dérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X (IPEX syndrome) (41).

Les mécanismes qui conduisent à la fonction suppressive des Tregs sont multiples et complexes. Après stimulation spécifique de leur TCR suite à la présentation antigénique par les CPA, les Tregs vont inhiber la prolifération et les fonctions des cellules effectrices telles que les LT CD4+ et CD8+, mais aussi les cellules dendritiques, les macrophages et les LB (Figure 8).

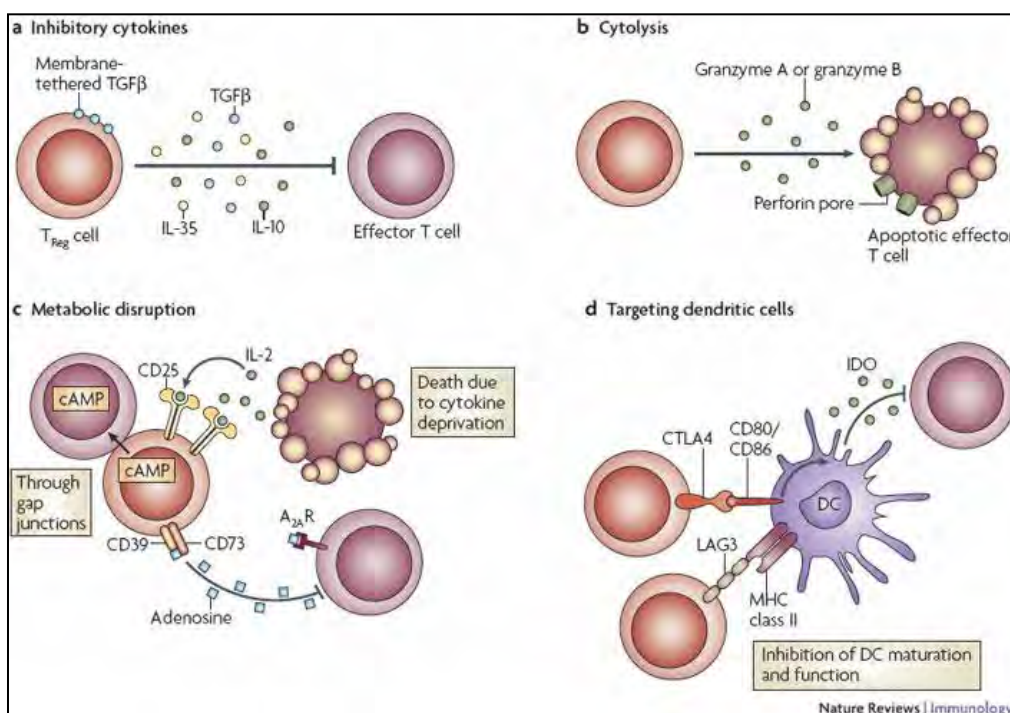


Figure 8 : Mécanismes conduisant aux fonctions immunosuppressives des Tregs. Vignali et al. (42)

Un des mécanismes qui semble majeur est la sécrétion de cytokines aux fonctions suppressives (Figure 8a) telles que l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35, qui sont capables d'induire un arrêt du cycle cellulaire et de conduire à un épuisement lymphocytaire.

De plus, les Tregs semblent présenter des propriétés cytolytiques (Figure 8b) via un contact direct avec les LT ou les CPA en induisant leur apoptose grâce à la sécrétion de granzymes et de perforines. La forte expression du CD25 (récepteur à l'IL-2) entraîne une consommation massive de l'IL-2 présent dans le milieu, privant les autres sous-populations de lymphocytes T par compétition d'une cytokine primordiale pour leur prolifération et leur survie (Figure 8c).

Les Tregs semblent aussi exprimer les molécules membranaires CD39 et CD73 qui auraient une action enzymatique de transformation de l'ATP extracellulaire en adénosine aux propriétés anti-inflammatoires (Figure 8c).

Les fonctions suppressives peuvent être également induites grâce à l'expression membranaire de molécules co-inhibitrices (Figure 8d) telles que le CTLA-4, PD-1 (CD279) ou LAG-3 (CD233) qui agiront via divers mécanismes. Par exemple, CTLA-4 interagit avec le complexe B7 (CD80/CD86) exprimé à la surface des DCs et inhibe ainsi le signal de co-stimulation. La capacité des DCs à stimuler les LT naïfs via le CD28 se trouve diminuée, entraînant une anergie lymphocytaire (état de non réponse lié à un défaut de co-stimulation). L'action de PD-1 est en partie similaire à celle du CTLA-4. LAG-3 est un homologue du CD4+ qui se lie avec une forte affinité au CMH II entraînant une inhibition de la maturation et des fonctions stimulatrices des DCs. D'autres molécules co-inhibitrices peuvent être exprimées à la surface des Tregs ; mais la liste est non exhaustive et leur connaissance est parfois approximative. (42)(43).

Autres lymphocytes T CD4+

Les principales catégories de T helpers sont représentés par les T_{H1}/ T_{H2}/ T_{H17}/Tregs mais il existe d'autres catégories moins décrites et présentant diverses fonctions que nous ne citerons que rapidement ici.

Les lymphocytes T_{H3} sont des LT CD4+ Foxp3+/- ayant des fonctions régulatrices via la sécrétion de TGF- β (44)(29).

Les lymphocytes T_{r1} sont des LT CD4+ Foxp3- ayant une activité régulatrice via la sécrétion d'IL-10 (45).

Les lymphocytes T_{H9} sont des LT CD4+ sécréteurs d'IL-9 jouant un rôle dans l'auto-immunité et l'immunité anti-helminthique (46).

Les lymphocytes T helpers folliculaires (T_{FH}) représentent une sous-population de LT CD4+ destinés à assister les lymphocytes B qui ont des fonctions essentielles dans la formation du centre germinatif, dans la création d'un répertoire BCR de haute affinité et dans le développement de LB mémoires et

de plasmocytes sécréteurs d'anticorps de haute affinité. Leur développement implique une stimulation en particulier par de l'IL-6 et la mise en jeu du facteur de transcription Bcl-6 (B cell lymphoma 6) (47).

2) e) Réponse cellulaire adaptative : lymphocytes T CD8+

LT CD8+ cytotoxiques

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont des LT CD8+ spécialisés dans l'élimination directe de cellules infectées (en particulier par des virus), malignes ou dont l'intégrité est altérée. La stimulation d'un LT CD8+ naïf se fait via la présentation d'un peptide étranger par une molécule de CMH I à la surface d'une CPA (présentation croisée seulement par les cellules dendritiques). Des signaux de co-stimulation sont envoyés grâce à la participation de nombreuses molécules membranaires, notamment par l'interaction du CD40L (CD40 ligand) d'un LT helper avec le CD40 de la CPA puis par l'interaction du CD28 du LT CD8+ naïf avec le complexe B7 (CD80/CD86) de la CPA. La production de cytokines pro-inflammatoire et en particulier l'IL-2 par la CPA activée, par le T helper et par le LT CD8+ stimulé vont permettre une amplification de l'activation et de la prolifération des LT CD8+ (Figure 9) (48).

La reconnaissance d'une cellule infectée par interaction entre le TCR du CTL et le complexe peptide-CMH de classe I entraîne une adhésion étroite à ces cellules. La stabilité de cette « synapse immunologique » est renforcée par des molécules d'adhérence, notamment des intégrines telles que LFA-1 exprimées par le CTL par interaction avec leurs ligands ICAM-1. Les CTL activées libèrent alors par exocytose le contenu de leurs granules : perforines et granzymes. La perforine par polymérisation va permettre la perméabilisation de la cellule cible et les granzymes libérés dans le cytoplasme vont entraîner l'apoptose. Les CTL activés expriment aussi une protéine membranaire, le Fas-Ligand (FasL), qui se lie à un récepteur inducteur de mort, appelé Fas (ou CD95) sur les cellules cibles et entraînent l'apoptose de celles-ci. En plus de leur capacité cytolytique, les CTL sont capables de sécréter des cytokines telles que l'IL-2, l'INF- γ , le TNF- α et certaines chimiokines qui permettent une intensification de la réponse anti-infectieuse. Ces médiateurs à propriétés pro-inflammatoires, vont permettre le recrutement et l'activation de macrophages et pour certains (l'INF- γ , TNF- α) des propriétés directement inhibitrices de la réplication virale (49).

A la suite de l'expansion clonale, la grande majorité des LT CD8+ spécifiques de l'antigène rencontré meurent, laissant derrière eux une petite population de LT CD8+ mémoires à longue durée de vie qui permettra une réponse plus efficace lors d'un éventuel nouveau contact avec l'antigène (se conférer à la partie LT mémoires) (50).

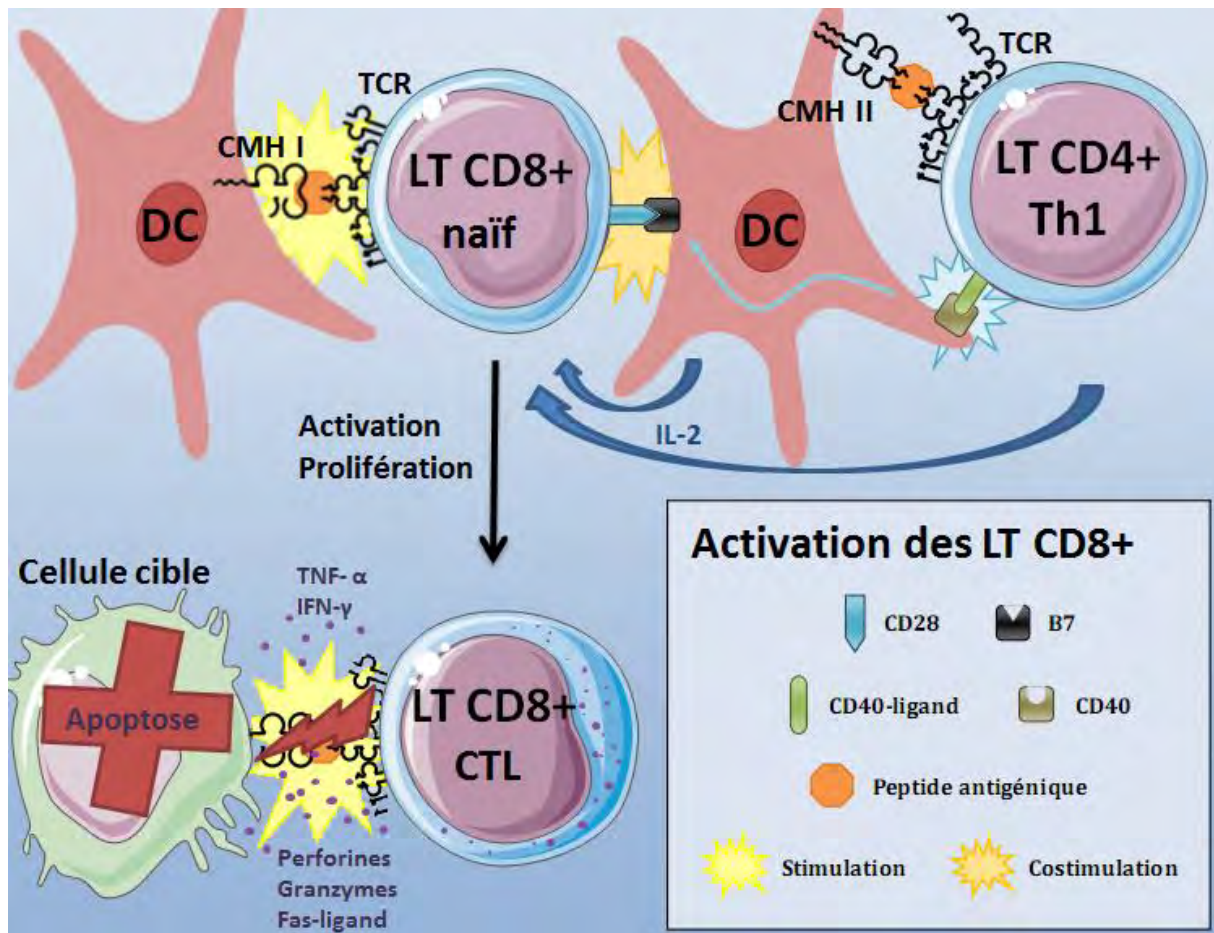


Figure 9 : Activation schématique des LTCD8+

L'activation lymphocytaire efficace des LT CD8+ naïfs nécessite différents signaux de stimulation et de co-stimulation :

- Initiation de l'activation lors de la présentation de l'antigène par les CPA par interaction CMH I – TCR puis transmission du signal intracellulaire via le co-récepteur CD3.
- Signaux de co-stimulation amorcés par le LTCD4+ helper notamment via l'interaction du CD40-L avec le CD40 de la CPA puis par interaction entre le complexe B7 (CD80/CD86) de la CPA avec le CD28 du LTCD8+.
- Sécrétion accrue d'IL-2 et autres cytokines pro-inflammatoire permettant de potentialiser l'activation et la prolifération des LTCD8+ effecteurs cytotoxiques et mémoires.

LT CD8+ régulateurs

Une population régulatrice a aussi été décrite au sein du compartiment lymphocytaire CD8+ (Tregs CD8+). Ces Tregs CD8+, d'une grande diversité, peuvent être générés dans le thymus ou en périphérie à partir de LTCD8+ naïfs. Cette population est de phénotype hétérogène et il n'a pas été mis en évidence de marqueurs spécifiques. Les Tregs CD8+ peuvent cependant partager des marqueurs phénotypiques communs avec les Tregs CD4+ comme le CD25 ou Foxp3 et peuvent aussi exprimer des marqueurs comme le GITR, le CTLA-4, le CD103 ou le CD122. Ils sont capables de produire des cytokines inhibitrices telles que l'IL-10 et le TGF-β et de modifier l'état d'activation des LT effecteurs et des CPA. (51)(52)(53).

2) f) Lymphocytes T mémoires

Lors d'une infection, la rencontre avec un antigène est marquée par la génération et la persistance de lymphocytes T mémoires garantissant une immunité protectrice vis-à-vis du pathogène spécifique tout au long de la vie.

Leur fréquence chez l'homme varie au cours du temps, et on observe trois principales phases (Figure 10) :

- Une phase initiale de génération intense à partir de la naissance et durant les deux premières décennies de la vie. C'est une période de grande susceptibilité aux infections et de croissance importante de la population des T mémoires.
- Un plateau est atteint à l'âge de 20 – 25 ans et la fréquence des T mémoires reste stable au cours de la vie d'adulte. Le taux de T mémoire est maintenu grâce à un turnover homéostatique. Cette période de la vie est de moindre sensibilité aux infections.
- Une phase d'immuno-sénescence apparaît vers 65 – 70 ans, marquée par une décroissance de la population T mémoire et par une perte progressive de leurs fonctions effectrices.

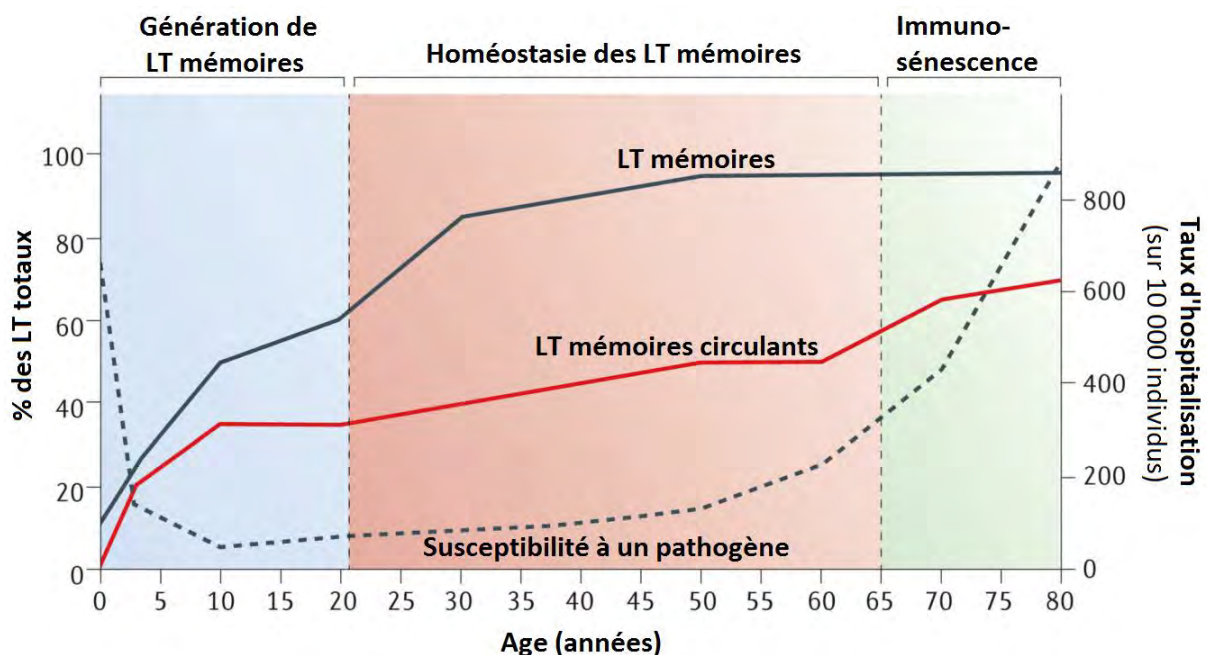


Figure 10 : Evolution du nombre du taux de LT mémoires et de la susceptibilité à un pathogène au cours de la vie (54)

La fraction de LT circulants représente environ 2 à 2.5% de la totalité des LT présents dans le corps (circulants et tissulaires). Sa composition varie au cours de la vie. Durant l'enfance et de l'adolescence, on observe une majorité de LT naïfs circulants. C'est une période de génération importante de LT mémoires qui vont atteindre un taux d'environ 35% des lymphocytes circulants au début de l'âge adulte. Au cours de la vie d'adulte le taux de LT mémoires atteint un plateau et

augmente progressivement au fil des années jusqu'à atteindre environ 50% des LT circulants. Aux alentours d'environ 65 ans la proportion de LT mémoires circulants augmente encore (moins de LT naifs circulants) mais sont marqués par une perte progressive de leurs fonctions effectrices (54).

Les LT mémoires chez l'homme sont classiquement distingués par l'expression de l'isoforme CD45RO et l'absence d'expression du CD45RA (CD45RO+ CD45RA-).

Au sein des T mémoires on différencie deux sous-populations en fonction de l'expression du CCR7 (récepteur à une chimiokine qui oriente le lymphocyte vers les ganglions lymphatiques) : CCR7+ pour les T mémoires centraux (T_{CM}) qui sont plutôt localisés au niveau des organes lymphoïdes secondaires et CCR7- pour les T mémoires effecteurs (T_{EM}) plutôt localisés au niveau des tissus périphériques. La L-sélectine CD62L est fortement exprimée sur le T_{CM} et faiblement sur le T_{EM} . Les deux sous populations expriment le CD127 (IL-7R α) et l'IL-15R leur procurant une faculté d'auto-renouvellement en absence d'antigène grâce à l'action de l'IL-7 et de l'IL-15 (54).

Dans le sang périphérique la plupart des lymphocytes T mémoires CD4+ et CD8+ sont producteurs d'IFN- γ , d'IL-2 ou de TNF- α (cytokines pro-inflammatoires) après une courte stimulation et seule une infime partie des LT mémoires CD4+ sont sécréteurs d'IL-4, d'IL-10 ou d'IL-17 (cytokines anti-inflammatoires).

La spécificité de la réponse adaptative est intrinsèquement liée à la génération et à la persistance de lymphocytes T mémoires ayant déjà interagit spécifiquement avec l'antigène via le TCR (54).

Les lymphocytes T, par leur capacité à sécréter des médiateurs solubles ou grâce à des mécanismes mettant en jeu un contact cellulaire direct, jouent un rôle important dans l'immunité. De nombreuses populations de lymphocytes T ont été décrites et initialement considérée comme des effecteurs complètement différenciés. Cette différenciation terminale arrêtée est largement remise en cause depuis plusieurs années et les fonctions et phénotypes des lymphocytes T effecteurs semblent plutôt présenter une flexibilité ou plasticité au cours du temps. Il semble en effet exister une grande variété de stades transitoires capables de produire des réponses cytokiniques hétérogènes et conservant une capacité de différenciation croisée entre différentes sous-populations lymphocytaires. Cette plasticité pourrait permettre une réponse plus équilibrée et plus adaptée vis-à-vis de chaque pathogène (55).

2) g) Lymphocytes T : phénotypes, facteurs de transcription et fonctions des principales sous-populations résumés en schémas

(Annexe 3) (56)

3) Sepsis : déséquilibre immunosuppresseur

La théorie incriminant l'hyper-inflammation comme principale cause de mortalité chez les patients atteints de sepsis a longtemps prédominé et orienté la recherche thérapeutique vers des traitements anti-inflammatoires. L'échec de nombreux essais thérapeutiques allant dans ce sens (anticorps monoclonal anti-TNF- α et antagoniste de l'IL-1R, blocage des TLR, antagonistes d'endotoxines) ont conduit à rechercher les causes de ces échecs et à remettre en cause cette théorie (57).

Des études post-mortem chez des patients décédés suite à un sepsis ont apporté de nouveaux éléments explicatifs et ont permis de mettre en évidence une altération des fonctions immunitaires de l'hôte. Le rôle central de l'immunosuppression au cours du sepsis a également été mis en évidence grâce au bénéfice apporté par des essais thérapeutiques visant à restaurer l'immunité chez ces patients par le biais de thérapeutiques ciblées (58).

Cette phase d'immunosuppression a initialement été perçue comme un mécanisme secondairement compensatoire de l'hyper-inflammation. Il semblerait en fait que les mécanismes pro-inflammatoires et immunosuppresseurs soient interdépendants, en concurrence et entrent en jeu plus ou moins simultanément lors du sepsis. En effet, certaines études menées chez des patients septiques ont montré que les cellules immunitaires étaient capables de produire rapidement et simultanément des cytokines pro et anti-inflammatoires, parfois à prédominance anti-inflammatoire. Certains patients présentaient une insuffisance de production cytokinique globale comparée à des patients non septiques (58)(59).

3) a) Apoptose et immunosuppression

Une avancée importante dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis a été la mise en évidence d'une déplétion intense en cellules immunitaires consécutive à une mort cellulaire par apoptose (60)(61).

Cette déplétion a lieu au sein de divers organes, en particulier les organes lymphoïdes primaires et secondaires et concerne les cellules de l'immunité innée et adaptative, notamment les LT CD4+ et CD8+, les lymphocytes B et les DCs. La perte considérable en cellules immunitaires conduit inévitablement à une immunosuppression, mais l'apoptose a aussi un impact sur les cellules immunitaire survivantes. En effet la phagocytose par les monocytes/macrophages et DCs de cellules apoptotiques va provoquer un phénomène de tolérance en induisant un état de non réponse immunitaire et en orientant la réponse lymphocytaire auxiliaire vers un profil Th2. La sécrétion d'IL-10 et de TGF- β anti-inflammatoires est alors favorisée tandis qu'on observe une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-12 (62). Cette

hyporéactivité immunitaire entrave alors la clairance efficace du pathogène et engendre une susceptibilité aux infections secondaires.

3) b) Impact du sepsis sur les cellules immunitaires

Au-delà de la perte quantitative consécutive à l'apoptose massive de cellules immunitaires, le sepsis est aussi responsable, directement ou indirectement, de l'altération des fonctions de la quasi-totalité des cellules impliquées dans l'immunité (Figure 11) (18).

Cellules de l'immunité innée

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) ont un rôle central dans le contrôle précoce de l'invasion par un pathogène. A la suite de leur maturation médullaire, ils circulent naturellement quelques heures à quelques jours avant d'entrer en apoptose et d'être épurés physiologiquement par des cellules phagocytaires tissulaires. Contrairement à ce que l'on peut observer pour les lymphocytes, le taux de neutrophiles entrant en apoptose semble diminuer lors du sepsis (63). Cette prolongation de la durée de vie et un accroissement de leur production médullaire entraîne une augmentation du nombre de PNN et de leurs précurseurs immatures circulants. En dépit de ce nombre augmenté, des fonctions indispensables à la clairance efficace du pathogène semblent altérées lors du sepsis. La réponse chimiotactique et donc la migration des PNN semble moins efficace chez des patients septiques ; ceci pourrait être expliqué par un défaut d'expression de CXCR2 et plus ou moins de CXCR1 (récepteurs aux chimiokines). Leur faculté phagocytaire semble conservée mais la production d'agents bactéricides, comme les espèces réactives de l'oxygène, la myéloperoxydase ou la lactoferrine, paraît altérée.

Lors du sepsis, les PNN semblent par ailleurs acquérir une aptitude à inhiber la réponse cellulaire adaptative en particulier les lymphocytes T, via notamment la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 même si cette hypothèse semble être remise en question chez l'homme. Des PNN isolés de patients septiques semblent aussi exprimer des molécules inhibitrices comme le PD-L1 (Programmed cell death receptor ligand-1) qui peut potentiellement induire une altération des fonctions lymphocytaires (64)(65)(66).

L'observation de ces anomalies à la fois quantitatives et fonctionnelles des PNN semble liée à un pronostic péjoratif (64).

Les MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells) sont une population de cellules immunitaires incluant les cellules myéloïdes matures et immatures qui semblent jouer un rôle immunosuppresseur au cours de l'inflammation et du sepsis en altérant particulièrement la réponse lymphocytaire T. Générés dans la moelle osseuse, ils se différencient rapidement, en situation physiologique, en PNN,

monocytes/macrophages et DCs matures. Dans des situations pathologiques comme le sepsis ou le cancer ils subissent un blocage partiel de leur différenciation résultant en une expansion de cette population. Dans ce contexte, leur activation entraîne l'expression de facteurs immunosuppresseurs comme l'arginase (codées par ARG1) ou comme une production accrue de NO, d'espèces réactives de l'oxygène ou de peroxy-nitrite (ONOO-) qui sont responsables d'une inhibition de la prolifération et de la fonctionnalité lymphocytaire T. Plus récemment des études ont montré la capacité des MDSCs à induire le développement de novo de Tregs Foxp3+. Leur mise en évidence est associée avec la survenue d'infections nosocomiales et à un pronostic péjoratif. (67)(68).

Les monocytes et macrophages voient aussi leurs fonctions immunitaires altérées lors du sepsis et entrent dans une phase de tolérance immunitaire. Au contact du lipopolysaccharide (LPS), ou autres agonistes des TLR, on observe une diminution de leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-1, CCL3, CCL4 ou CXCL10 et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF- β et l'IL-1Ra (antagoniste au récepteur de l'IL-1). Ce phénomène de tolérance aux endotoxines « endotoxin tolerance » semble lié à un changement dans la signalisation intracellulaire. Ce profil de sécrétion cytokinique modifié oriente la réponse lymphocytaire vers un profil Th2 et une activation des lymphocytes Tregs. Il conduit aussi à une fonction phagocytaire exacerbée des monocytes/macrophages, associée à une capacité conservée à détruire les pathogènes phagocytés mais à une perte des fonctions de présentation de l'antigène. L'exacerbation de la phagocytose semble liée à une expression augmentée du CD64 (récepteur au fragment Fc γ des Igs) alors que l'altération de la fonction de présentation de l'antigène semble liée à une diminution importante de l'expression des molécules de CMH de classe II (HLA-DR) en surface. Lors du sepsis, les monocytes peuvent aussi exprimer en surface PD-L1 qui en se liant à PD-1, son récepteur lymphocytaire, exacerbe l'altération de la réponse lymphocytaire T déjà entraînée par le défaut de présentation de l'antigène et la modification du profil de sécrétion cytokinique. Il a été montré que la diminution et la persistance de la diminution de l'expression du HLA-DR en surface des monocytes/macrophages était un bon marqueur prédictif de mortalité et de survenue d'infections nosocomiales. L'expression de PD-L1 par les monocytes semble aussi être un bon marqueur pronostique lors du sepsis (69)(70)(71)(72).

Les cellules dendritiques subissent aussi de profondes modifications fonctionnelles et quantitatives lors du sepsis. Les DCs subissent une apoptose massive chez les patients septiques, ce qui a pour conséquence une perte importante du nombre de DCs circulantes ainsi que de celles retrouvées au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Cette perte semble associée à une survenue majorée d'infections nosocomiales et à un pronostic péjoratif (73). Outre l'apoptose, le sepsis engendre aussi de profondes modifications fonctionnelles. Il a été observé une diminution de l'expression

membranaire de HLA –DR qui altère directement la fonction de présentation de l’antigène. Le profil de sécrétion cytokinique apparait aussi aberrant lors du sepsis avec une capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 et IL-12) diminuée alors que des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF β) semblent maintenues voire augmentées. Comme pour les macrophages, le profil cytokinique anti-inflammatoire et le défaut de présentation antigénique semblent entrainer une incapacité à stimuler l’activation lymphocytaire T effectrice et favoriser une prolifération préférentielle des lymphocytes Tregs. On parle alors de DCs dites régulatrices. (18)(74)

Les lymphocytes NK sont aussi affectés lors du sepsis. Il a été observé une diminution significative et persistante des NK circulants, même si leur localisation préférentiellement tissulaire rend leur étude difficile. Les fonctions des NK semblent aussi affectées et en particulier leurs fonctions cytotoxiques et de sécrétion de cytokines. La diminution de production d’IFN- γ accroît notamment la susceptibilité aux infections et réactivations virales (18).

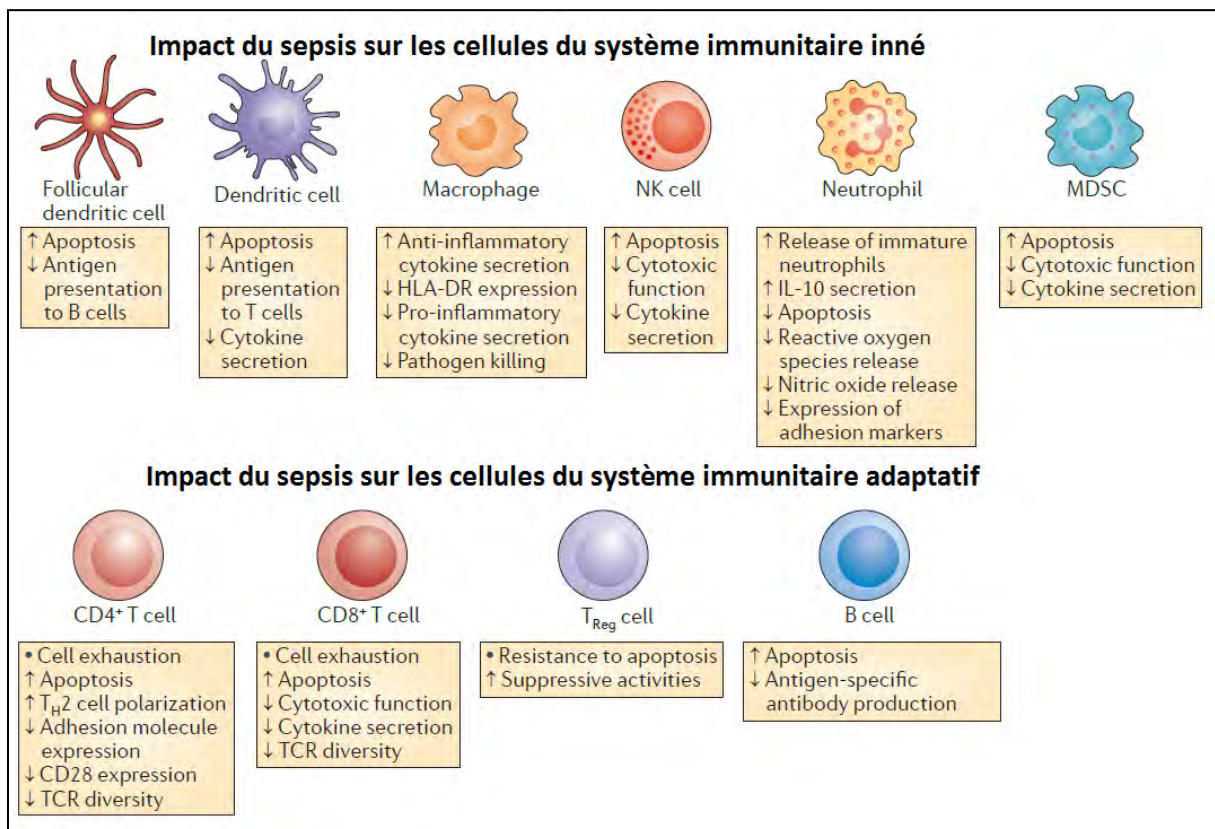


Figure 11 : Impact du sepsis sur les cellules du système immunitaire inné et adaptatif
Hotchkiss et al. (18)

Cellules de l’immunité adaptative

Comme on l’a vu précédemment, l’apoptose de cellules immunitaires concerne les LT CD4+, les LT CD8+, les NK et les lymphocytes B. Plusieurs études cliniques ont mis en évidence une lymphopénie, parfois persistante, chez les patients septiques. La numération des lymphocytes

circulants est un paramètre disponible très facilement en routine et il a été montré qu'une lymphopénie précoce et persistante chez les patients septiques ou en choc septique était associée à la survenue d'infections nosocomiales, pouvait prédire la mortalité précoce et tardive et constituait ainsi un bon marqueur d'immunodépression liée au sepsis. (61)(75)(76)

La réponse T CD4+ auxiliaire est profondément modifiée lors du sepsis. Des études récentes semblent montrer que les sous populations T_H1, T_H2 et T_H17 sont fonctionnellement et quantitativement altérées. Parmi celles-ci, certaines ont montré une altération de la production cytokinique concernant à la fois les profils T_H1 et T_H2. Par exemple, Boomer et al. (77) ont utilisé des splénocytes issus de 40 patients décédés suite à un sepsis en comparaison avec des lymphocytes de patients non-septiques puis ont stimulé la réaction lymphocytaire avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ou avec du LPS durant 5 heures. Les sécrétions de TNF- α , d'IFN- γ , d'IL-6 et d'IL-10 étaient quasi-inexistantes et significativement diminuées par rapport aux contrôles. Ce groupe a aussi étudié par cytométrie en flux, l'expression de marqueur de surface cellulaire sur les lymphocytes T et les CPA. Il a été observé l'expression de molécules d'activation sur les LT (CD4+ et CD8+) comme CD69 et CD25 (récepteur à l'IL-2) ainsi que l'expression diminuée du récepteur de co-stimulation CD28 et du récepteur à l'IL-7 (CD127) indispensables à l'activation et à la survie lymphocytaire. Ils ont aussi observé une expression augmentée de récepteurs co-inhibiteurs comme PD-1 (CD279) et CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 ou CD152). De la même façon que pour les LT, l'expression du CD86 (ligand de co-stimulation sur le CD28 des LT) était diminuée alors que l'expression de PD-L1 (ligand de PD-1 sur les LT) était augmentée sur les CPAs (macrophages et DCs).

D'autres études ont montré une diminution de l'expression de Tbet, GATA-3 et ROR- γ t, facteurs de transcription régulant l'action des LT CD4+ respectivement T_H1, T_H2 et T_H17, chez des patients septiques (76)(78). Des modèles murins ont aussi permis de mettre en évidence des méthylations sur les histones et des remodelages chromatinien au niveau des régions promotrices de Tbet et GATA-3 lors du sepsis, qui pourraient contribuer à l'épuisement lymphocytaire T CD4+ (79). Des études portant sur la diversité du répertoire TCR par biologie moléculaire ont été récemment menées et semblent montrer une diminution précoce de cette diversité chez des patients en choc septique. La plupart des patients semble récupérer en quelques jours une diversité TCR normale et la non-récupération de cette diversité de TCR apparaît liée à un pronostic défavorable et à la survenue d'infections nosocomiales et de réactivations virales (80)(81).

Tous ces résultats vont dans le sens d'une fonction lymphocytaire T très altérée lors du sepsis et cet état est défini par le terme d'épuisement lymphocytaire ou « T cell exhaustion ».

3) c) Epuisement lymphocytaire : T cell exhaustion

Modèle de l'infection virale chronique

L'épuisement lymphocytaire a été décrit pour la première fois il y a une vingtaine d'années sur des souris présentant une infection virale chronique et pour lesquelles une altération des fonctions lymphocytaires T avait été mise en évidence (82)(83).

Depuis, de nombreuses études basées sur des modèles murins et humains ont permis de mettre en évidence l'épuisement lymphocytaire dans diverses situations d'infections virales, parasitaires, bactériennes et également dans les processus tumoraux. La durée prolongée du sepsis se caractérise par une charge importante en antigène et une sécrétion importante de cytokines pro et anti-inflammatoires qui constituent des bases idéales pour le développement de l'épuisement lymphocytaire. Cet état est plus décrit pour les lymphocytes CD8+ que pour les CD4+ même si on a vu précédemment que des phénomènes comparables étaient aussi rapportés pour les LT CD4+.

Physiopathologie de l'« exhaustion »

Lors d'une infection, la réponse cellulaire adaptative se met en place initialement au moment de la présentation de l'antigène par une CPA. Les LT naïfs alors activés grâce à l'intervention de signaux de co-stimulation, se différencient en lymphocytes T effecteurs spécifiques de l'Ag dont les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL). Le pathogène est normalement rapidement éradiqué et la majorité des LT entrent en apoptose et sont éliminés par des phagocytes. Ne subsistent alors qu'une petite fraction de ces T effecteurs qui gardent un potentiel d'auto-renouvellement médié par l'IL-7 et l'IL-15 en dehors de tout contact avec l'Ag. Contrairement aux LT épuisés (Tex : exhausted) ces T CD8+ mémoires polyfonctionnels conservent de hautes capacités fonctionnelles comme les propriétés de sécrétion de cytokines, la cytotoxicité, un potentiel prolifératif et une résistance à l'apoptose (Figure 12) qui leur permet une réponse plus efficace lors d'un éventuel nouveau contact avec l'Ag spécifique. Les Tex, quant à eux, exprimeront faiblement le CD127 (récepteur à l'IL-7) et le CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2 et l'IL-15) et perdent ainsi leur capacité d'auto-renouvellement (84).

Lors d'une interaction prolongée avec un pathogène, et dans un contexte d'inflammation, la différenciation en T mémoires est profondément altérée et les fonctionnalités du LT CD8+ effecteur semblent être affectées graduellement (Figure 12). Les fonctions de sécrétion d'IL-2, de cytotoxicité et de prolifération intensive semblent être les premières à être touchées, puis le défaut de sécrétion de TNF- α à un stade intermédiaire, et enfin la diminution de sécrétion d'INF- γ semble intervenir à un stade plus sévère. Une charge antigénique élevée ainsi qu'une perte des fonctions auxiliaires des CD4+ apparaissent corrélées à la profondeur de l'épuisement.

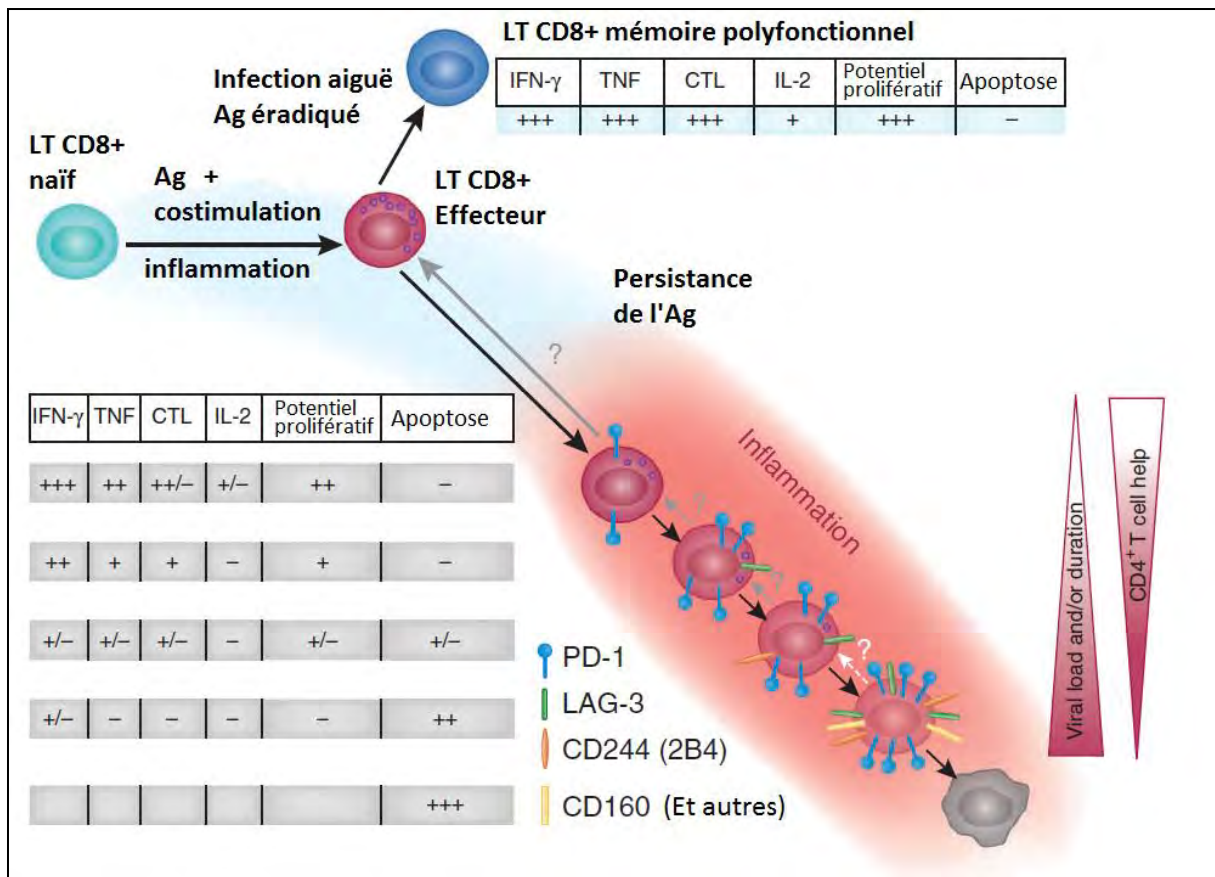


Figure 12 : Développement progressif de l'épuisement lymphocytaire lié au contact prolongé avec un antigène

Lors d'une infection aiguë l'activation d'un LT naif suite à la présentation de l'antigène et aux signaux de co-stimulation conduit à la production de LT effecteurs. Après éradication du pathogène, la plupart des LT entrent en apoptose excepté un contingent qui va persister et constituer une population de LT mémoires. aux capacités de sécrétion cytokinique, cytotoxiques et un potentiel prolifératif conservés en vue d'une nouvelle exposition à l'antigène.

Si l'infection persiste, la charge antigénique augmente tandis que les LT perdent progressivement leurs fonctions effectrices de manière hiérarchique. Parallèlement, les LT vont exprimer à leur surface des récepteurs co-inhibiteurs ou « immune checkpoint ». Cet épuisement lymphocytaire s'associe à une diminution des fonctions auxiliaires des LT CD4⁺ et à une augmentation de la charge antigénique. Wherry (2011) (84)

Il existe une diversité dans l'épuisement lymphocytaire liée à des facteurs comme le type de pathogène, son tropisme, la localisation et la sévérité de l'infection et l'intégrité des fonctions de présentation de l'antigène et de l'architecture lymphoïde.

Après moins d'une semaine d'exposition à un Ag il semblerait que l'épuisement lymphocytaire reste réversible et que les Tex gardent la capacité à se différencier en T CD8⁺ mémoires polyfonctionnels. Après 2 à 4 semaines d'exposition à l'Ag, un épuisement plus profond semble s'établir et il apparaît que les Tex perdent irrémédiablement la capacité à récupérer des fonctions effectrices, même après éradication du pathogène (85)(84).

La physiopathologie de l'épuisement lymphocytaire ne peut être expliquée sans le concours de signaux inhibiteurs impliquant des médiateurs solubles, l'expression de molécules co-inhibitrices ou par l'intervention de Tregs, de TCD4+ helpers ou de CPA (Figure 13).

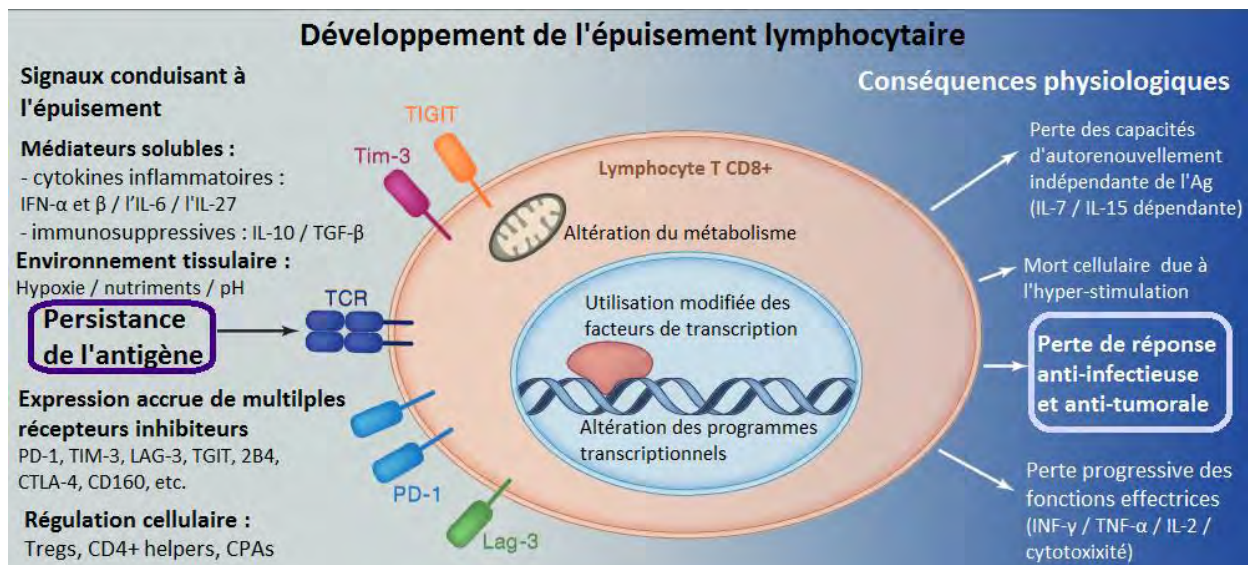


Figure 13 : Développement de l'épuisement lymphocytaire

Schéma résumant les mécanismes et signaux qui conduisent à l'épuisement lymphocytaire ainsi que les conséquences physiologiques qui en découlent.

Snapshot : T cell Exhaustion : Pauken KE. et Wherry EJ.

Parmi les médiateurs solubles, sont impliquées des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β mais aussi des cytokines inflammatoires comme les interférons de type I (IFN- α et β), l'IL-6 et l'IL-27. (84)

Ces lymphocytes T épuisés, plutôt qu'un type cellulaire arrêté, semblent bien représenter un état distinct de différenciation lymphocytaire et la compréhension des mécanismes qui y mènent, a permis de déterminer plus précisément leurs fonctions et phénotypes particuliers (85).

Modifications phénotypiques lors de l'épuisement lymphocytaire

Il existe une variété importante de récepteurs co-stimulateurs et co-inhibiteurs à surface des lymphocytes T (Annexe 4) (86). Aussi connus sous le nom d'« immune checkpoint », ils jouent un rôle crucial dans l'immunité adaptative à toutes les étapes de la réponse immunitaire, autant dans des situations physiologiques que pathologiques en permettant de moduler le signal d'activation du TCR. Chaque type d'immune checkpoint peut avoir préférentiellement des fonctions activatrices ou des fonctions inhibitrices du système immunitaire. Cependant une même molécule peut exercer des fonctions opposées (activatrices ou inhibitrices) selon le contexte.

Quatre principales familles ont été décrites (87):

- **Famille CD28/B7** incluant CD28, CTLA-4 (CD152 : cytotoxic T lymphocyte antigen 4), PD-1 (CD279 : programmed cell death protein 1), ICOS (Inducible T-cell Costimulator) et BTLA (CD272 : B- and T-lymphocyte attenuator).
- **Famille des immunoglobulines** incluant TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), LAG-3 (CD233 : lymphocyte-activation protein 3) et CD160.
- **Famille des récepteurs au TNF- α** incluant CD27, CD137 (4-1BB).
- **Famille de SLAM/CD2** incluant SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule), 2B4 (CD244) et CD48.

Chaque molécule co-stimulatrice ou co-inhibitrice interagit avec un ou plusieurs récepteurs différents exprimés par un ou plusieurs types cellulaires (Figure 14).

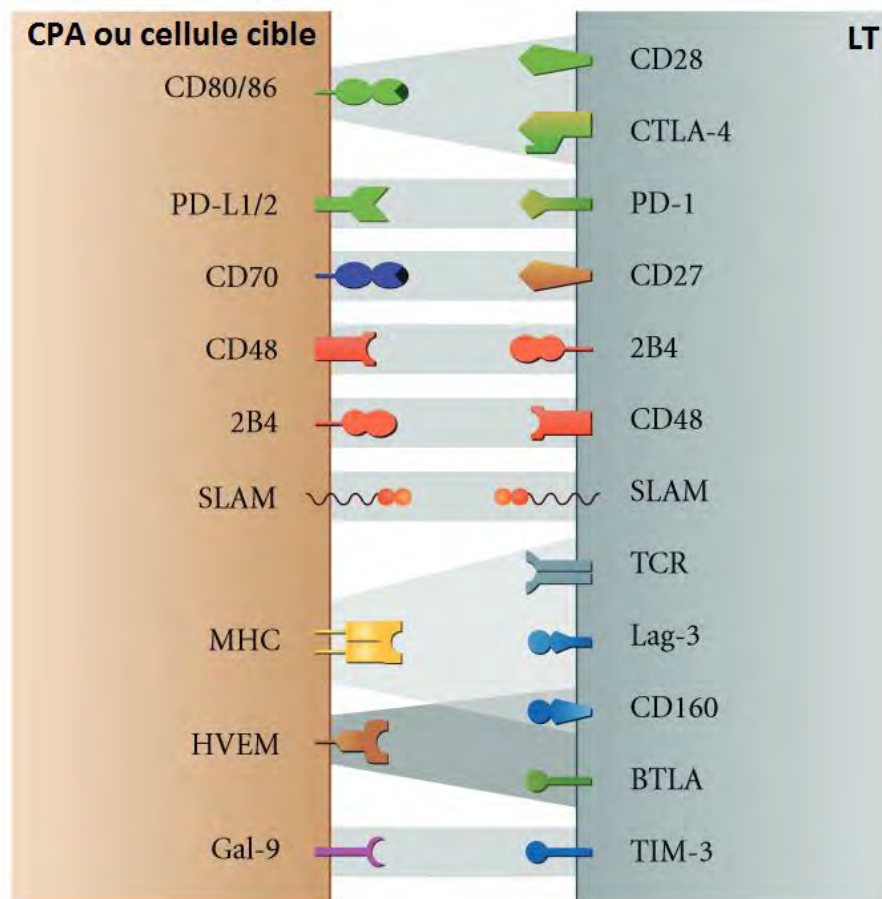


Figure 14 : Molécules régulatrices et leurs ligands

Localisation préférentielle sur le LT (à droite) ou sur la cellule cible ou CPA (à gauche).

Un code couleur détermine l'appartenance à une sous famille : **vert** pour la famille B7, **bleu** pour la famille des immunoglobulines, **orange** pour la famille SLAM/CD2 et **jaune-orange** pour les récepteurs au TNF- α .
Vigano et al. (87).

Les récepteurs co-inhibiteurs sont notamment impliqués dans les phénomènes de tolérance au soi et de prévention des phénomènes auto-immunité. Même s'ils peuvent être exprimés transitoirement

lors de l'activation lymphocytaire (Figure 15) et à la surface des cellules effectrices et mémoires, une expression prononcée et prolongée de plusieurs de ces récepteurs semble être un bon marqueur d'épuisement lymphocytaire, de même qu'une expression réduite de récepteurs co-stimulateurs (ex: CD28, CD127 ou IL-7R).

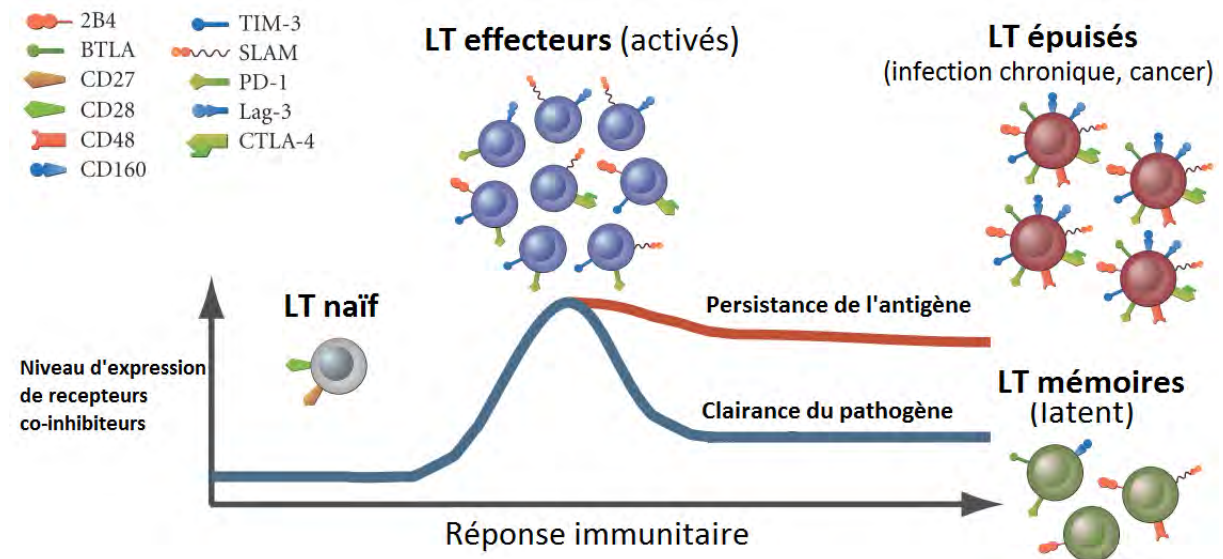


Figure 15 : Profil d'expression des immune checkpoints au cours d'une infection

Après infection par un agent pathogène et activation lymphocytaire, différentes molécules co-stimulatrices et co-inhibitrices (ICPs) sont exprimées suivant des cinétiques variables et régulent le développement et le devenir des cellules effectrices.

Le plus souvent lors d'une infection, l'activation des LT conduit au contrôle de l'infection et à la génération de LT mémoires. Au cours de ce processus des récepteurs co-inhibiteurs sont faiblement exprimés à la surface des LT effecteurs et des LT mémoires.

Lorsque l'infection n'est pas contrôlée, la stimulation continue des LT due à la persistance de l'Ag entraîne un épuisement lymphocytaire associé à l'expression simultanée de plusieurs molécules co-inhibitrices et à une perte des fonctions inhibitrices. Vigano et al. / Fuertes Marraco et al. (87)(88).

Au cours des dernières années de nombreuses études ont permis de mettre en évidence le lien entre l'épuisement lymphocytaire et l'expression de divers récepteurs co-inhibiteurs à la surface lymphocytaire au cours de différentes situations infectieuses (notamment virales) et cancéreuses à la fois chez des modèles murins et humains (89)(90)(91)(92)(93)(94)(95)(96)(97)(98).

Des travaux de recherche, dont un bon exemple est celui menée par Blackburn et al. (89), ont aussi montré le lien entre l'intensité ainsi que la multiplicité de l'expression de ces récepteurs co-inhibiteurs et la sévérité de l'infection. D'autres études murines et humaines, via des stratégies visant à bloquer ces récepteurs co-inhibiteurs (« immune checkpoint inhibitors »), ont souvent permis de restaurer les fonctions effectrices des lymphocytes T et de permettre une amélioration dans la survie à certaines infections ou tumeurs (57)(99)(88)(100). Tous ces travaux montrent que ces récepteurs co-inhibiteurs ne sont pas seulement de bons marqueurs mais qu'ils ont surtout un rôle crucial dans la régulation et le développement des dysfonctions lymphocytaires.

Impact de l'expression des récepteurs co-inhibiteurs sur les fonctions lymphocytaires

La compréhension des mécanismes par lesquels agissent les récepteurs co-inhibiteurs est primordiale en vue du développement de thérapeutiques ciblées visant à restaurer les fonctions effectrices des LT aussi bien dans les infections chroniques que dans le cancer. Les ligands spécifiques de ces récepteurs co-inhibiteurs sont généralement présents sur les CPA (monocytes/macrophages/DCs) et sur les cellules cibles des LT engageant le signal inhibiteur via divers mécanismes.

Le premier mécanisme régulant négativement la réponse immunitaire est l'entrée en compétition des récepteurs inhibiteurs avec des ligands co-stimulateurs en empêchant ainsi la génération du signal d'activation (Figure 16). Par exemple le CTLA-4 entre en compétition avec le CD28 pour la fixation sur leur récepteur commun : B7 (CD80 et CD86). De la même façon PD-L1 (ligand de PD-1) fixe à la fois B7 et PD-1, empêchant la fixation du CD28 et enrayant le signal d'activation.

Un deuxième mécanisme est l'inhibition intracellulaire des signaux d'activation induits à la fois par la fixation de l'antigène sur les TCR/BCR et par les récepteurs co-stimulateurs. En ciblant directement les fractions intracellulaires de ces récepteurs activateurs ou en ciblant les molécules responsables de la chaîne de signalisation intracellulaire, les récepteurs co-inhibiteurs vont atténuer l'expression de gènes responsables de l'activation lymphocytaire en ayant des effets délétères sur la survie, la prolifération et le métabolisme cellulaire (Figure 16). Pour moduler les signaux d'activation intracellulaire, les récepteurs co-inhibiteurs vont également, via leur fraction intracellulaire, activer des motifs séquentiels dont le plus représentatif est le motif ITIM (immunoreceptor-based inhibitory motif). Lors de leur activation, ces motifs vont entraîner des réactions intracellulaires en chaîne conduisant à la déphosphorylation de molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire du TCR/BCR et des récepteurs co-stimulateurs. Ce mécanisme d'inhibition n'empêche pas totalement l'activation lymphocytaire mais permet de la moduler au cours de diverses situations physiopathologiques.

Outre ces deux mécanismes, il semblerait que les récepteurs co-inhibiteurs soient capables de favoriser l'expression de gènes responsables des dysfonctions lymphocytaires et d'inhiber certains gènes pro-inflammatoires (Figure 16). Chaque type de récepteur co-inhibiteur peut induire une combinaison variable de ces différents mécanismes. Il est aussi très probable que certains mécanismes demeurent encore méconnus (101)(84).

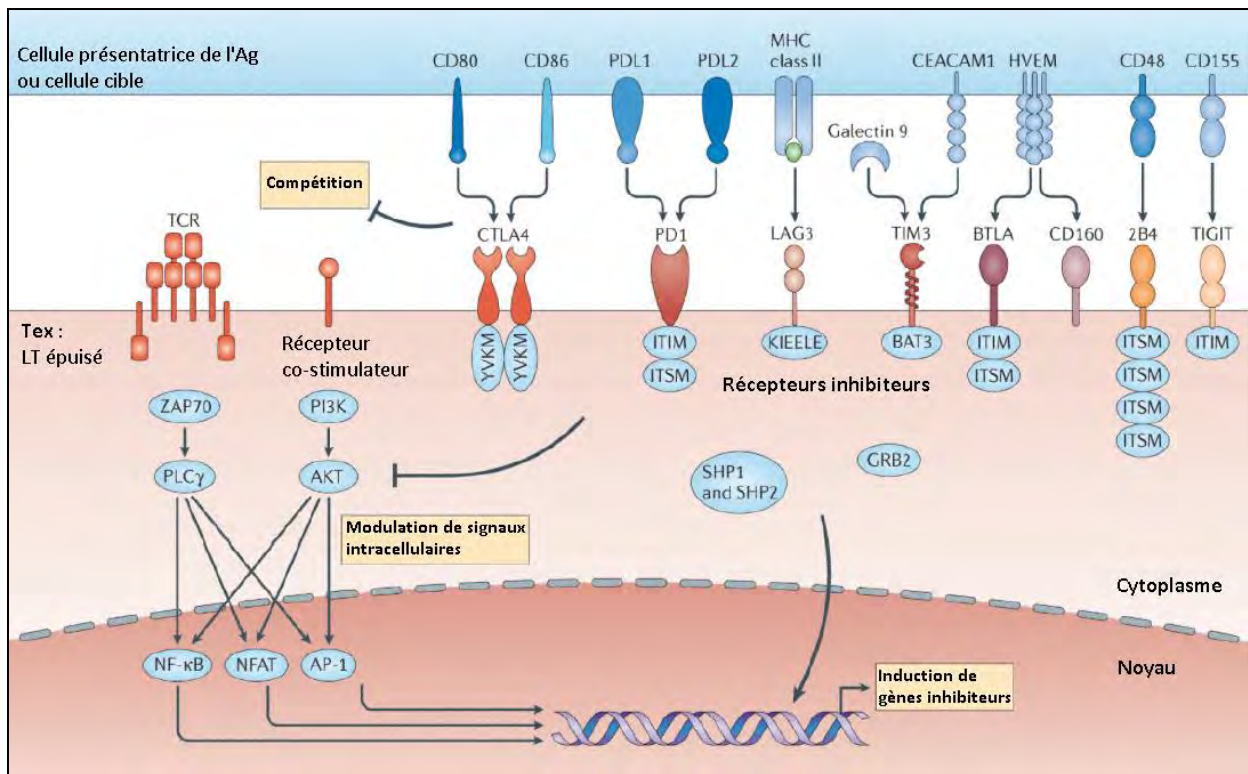


Figure 16 : Mécanismes moléculaires induits par les récepteurs co-inhibiteurs et conduisant à l'épuisement lymphocytaire

Il existe 3 principaux mécanismes : un mécanisme de compétition au niveau de la fixation extracellulaire sur les récepteurs co-stimulateur, un mécanisme de régulation intracellulaire des signaux induits par le TCR/BCR et par les récepteurs co-stimulateur, et la régulation positive de l'expression de gènes impliqués dans les dysfonctions lymphocytaires. Traduit de Wherry and Kurachi (82).

LT CD4+, Tregs et épuisement lymphocytaire

Nous avons précédemment décrit le rôle des Tregs CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ CD127^{low} dans la réponse immunitaire au cours de diverses infections. Les Tregs peuvent moduler la réponse lymphocytaire T au cours d'infections aiguës ou de la phase aiguë d'infections chroniques mais leur rôle dans le développement de l'épuisement lymphocytaire reste mal connu.

De nombreuses études ont montré une fréquence augmentée de Tregs circulants au cours d'infections virales chroniques ou notamment au cours du sepsis. La plupart des études semblent en fait montrer une augmentation relative par rapport aux autres fractions de LT CD4⁺ et non une augmentation absolue. Ces résultats semblent aller en faveur d'une meilleure résistance à l'apoptose induite par le sepsis des Tregs par rapport aux autres sous-populations CD4⁺. Une autre information intéressante apportée par ces études est que la persistance des Tregs semble être associée à un pronostic péjoratif (102)(103)(104)(105).

Les Tregs sont capables de sécréter des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10, le TGF-β ou l'IL-35 ; ce qui pourrait probablement suggérer au moins partiellement leur implication dans l'épuisement lymphocytaire. D'autre part, on a vu que les Tregs pouvaient exprimer à leur surface

des récepteurs inhibiteurs et notamment PD-1 et CTLA-4, pouvant aussi constituer un mécanisme conduisant à l'épuisement.

Une étude récente menée par Penalzoza-MacMaster et al. (106) a démontré cette implication des Tregs dans l'épuisement lymphocytaire sans toutefois pouvoir en élucider les mécanismes. En effet, sur des souris présentant une infection chronique à LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus), la déplétion expérimentale en Tregs a permis une restauration importante en LT CD8+ effecteurs spécifiques du LCMV sans toutefois diminuer la charge virale. Elle a aussi permis la potentialisation du traitement spécifique par blocage de PD-1 en réduisant significativement la charge virale. Une autre étude intéressante de Venet et al. (103) a aussi montré l'association entre l'augmentation relative des Tregs et les dysfonctions lymphocytaires, cette fois-ci au cours du sepsis.

Une meilleure connaissance des mécanismes par lesquels les Tregs favorisent l'épuisement lymphocytaire pourrait être utile au développement de nouvelles thérapeutiques immuno-stimulatrices.

Il semble vraisemblable que le manque de stimulation par les LT CD4+ helpers liée au sepsis participe au développement de l'épuisement lymphocytaire T CD8+ (84). Ce défaut dans les activités auxiliaires des LT CD4+ est lié à leur perte massive par apoptose lors du sepsis ainsi qu'à une modification profonde de leurs fonctions.

Ces dysfonctions traduisent un état d'épuisement lymphocytaire CD4+ comparable à celui observé sur les LT CD8+ même s'ils sont bien moins décrits et que les mécanismes et les marqueurs phénotypiques et transcriptionnels ne sont pas exactement les mêmes.

On peut observer par exemple une capacité diminuée de sécrétion de cytokines comme l'IFN- γ et le TNF- α .

On observe aussi l'expression de récepteurs co-inhibiteurs comme PD-1 et CTLA-4. Toutefois le répertoire de récepteurs inhibiteurs membranaires semble différer entre les Tex CD4+ et CD8+.

D'autres différences ont été observées ; par exemple, les dysfonctions semblent apparaître plus rapidement pour les TCD4+ que pour les TCD8+ et les Tex CD4+ gardent le plus souvent leur capacité à sécréter de l'IL-10 qui aura un effet potentialisateur de l'épuisement lymphocytaire TCD8+ (107)(84).

4) Objectifs de l'étude

Dans un contexte où les principales causes de mortalité et de complications tardives liées au sepsis semblent être la conséquence d'un échec du système immunitaire, de nombreuses thérapies immuno-stimulatrices voient le jour. Il apparaît désormais important de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à cet état d'immunosuppression et de disposer de marqueurs précoces qui pourraient permettre une prise en charge rapide et une amélioration la survie.

Cette étude a été menée de manière prospective sur une cohorte de 80 patients en choc septique. L'objectif était d'étudier l'évolution quantitative et phénotypique des populations lymphocytaires T CD8+, CD4+ et des Tregs dans les premiers jours du sepsis. L'expression membranaire de 3 récepteurs inhibiteurs (PD-1, 2B4 et CD160) a été étudiée sur les LTCD4+ et LTCD8+ et l'expression de PD-1 sur les Tregs. Un objectif secondaire était de mettre en évidence des marqueurs précoces d'épuisement lymphocytaire associés au pronostic, et les profils immunitaires ont ensuite été confrontés à l'évolution clinique des patients.

Partie 2 : Matériel et méthodes

1) Population étudiée

Il s'agit d'une étude observationnelle monocentrique prospective non interventionnelle menée dans un service de réanimation du CHU de Toulouse entre mai 2015 et septembre 2016.

Les patients en choc septique admis en réanimation depuis moins de 36 heures ont été inclus dans l'étude.

Le protocole de recherche a été validé par le comité d'éthique du CHU de Toulouse.

Les critères de non-inclusion étaient :

- Le refus de participer à l'étude
- Les patients mineurs
- Les patients ayant une hémopathie maligne
- Les patients ayant un cancer solide évolutif ou en rémission depuis moins de 6 mois
- Les patients ayant eu une hospitalisation en réanimation pour sepsis dans les trois mois précédents
- Les patients ayant reçu un traitement par sérum anti-lymphocytaire dans les 6 mois précédents

80 patients ont été inclus dans ce protocole de recherche entre mai 2015 et septembre 2016.

La moyenne d'âge était de 63 ans, avec des patients de 21 ans à 85 ans.

34 femmes et 46 hommes ont été inclus.

Parmi eux, 13 étaient greffés (5 patients transplantés rénaux, 4 hépatiques, 3 cardiaques, 1 pulmonaire) et donc possiblement dans un état d'immunosuppression avant même l'inclusion.

80 Patients	J28	J90
Vivants	63 79%	57 71%
Décédés	17 21%	21 29%
Perdus de vue	0	2

Tableau 5 : Survie à J28 et J90 post-sepsis des patients inclus dans l'étude

2) Echantillons biologiques

Un prélèvement de sang total sur tube EDTA était prélevé dans les 36 heures suivant l'admission en service de réanimation, puis après 3 jours puis 7 jours quand c'était possible (décès, sorties).

Nous avons pu récupérer les échantillons de 80 patients à J1, 57 patients à J3 et 36 patients à J7.

3) Cytométrie en flux et notions d'immunophénotypage

La CMF ou cytométrie en flux (cyto : cellule ; métrie : mesure) est une technique analytique permettant la caractérisation simultanée et individuelle de plusieurs caractéristiques physiques sur chacune des cellules présentes au sein d'une suspension (telles que la taille, la forme et la complexité et n'importe quel composant ou fonction qui puisse être détecté par un anticorps). Elle utilise la fluorescence, des moyens fluidiques, optiques et un système informatique pour le traitement des données.

Les cellules sont entraînées par un flux laminaire continu de très faible diamètre et passent les unes derrière les autres à grande vitesse à travers un ou plusieurs faisceaux lasers dans une cellule d'analyse. Les cellules en suspension (en particulier dans les liquides biologiques : sang, moelle osseuse, liquide céphalo-rachidien etc.) sont analysées grâce aux signaux lumineux qu'elles diffusent au moment du passage devant les lasers. La diffusion axiale du laser bleu (FSC : forward scatter) donne des informations sur la taille de la cellule et la diffusion latérale (à 90°) donne des informations sur sa granularité et sa complexité (SSC : side scatter). Les émissions d'ondes lumineuses ainsi diffractées sont capturées par des détecteurs électroniques (photodiodes). L'utilisation de fluorochromes (colorants fluorescent) fixés sur des anticorps permet d'obtenir des informations complémentaires grâce à un marquage spécifique des structures (ex : CD ou cluster of differentiation sur les leucocytes) ou des fonctions cellulaires. Les cellules marquées par des fluorochromes émettent des signaux à différentes longueurs d'onde qui sont triés par des jeux de miroirs sélectifs (dichroïques) et de filtres (en ligne ou en étoile) puis captés par des photomultiplicateurs (PMT) de meilleure amplification électronique (Figure 17).

L'intensité des signaux émis est directement dépendante de la taille de l'évènement analysé et de la densité de molécules marquées, ce qui permet un décompte précis du nombre d'éléments analysés et une analyse quantitative. Plusieurs signaux peuvent être analysés simultanément ce qui permet une analyse multiparamétrique de chacune des cellules analysées.

Les données sont ensuite transmises à l'ordinateur qui les analyse et les retranscrit sous forme d'histogrammes monoparamétriques ou biparamétriques.

L'étude de ces histogrammes nous permet d'apprécier le pourcentage de cellules exprimant un marqueur et le niveau d'expression de ces marqueurs sur chaque cellule.

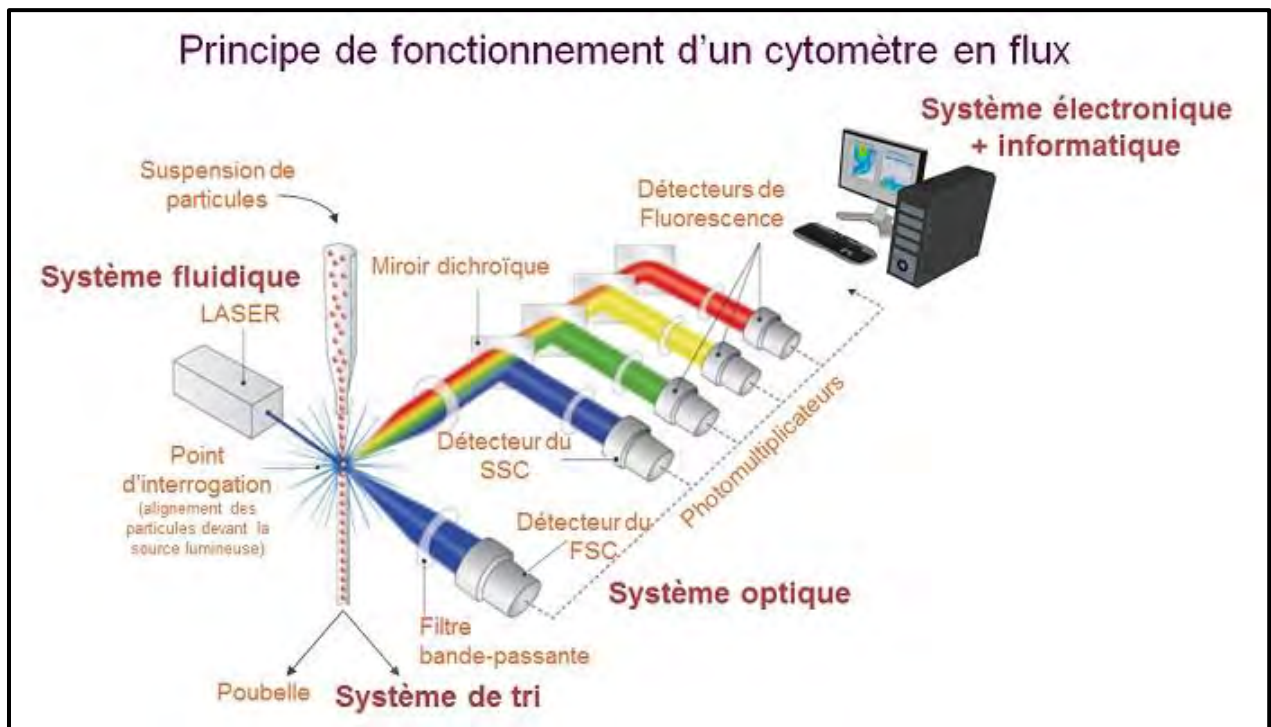


Figure 17 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

Excitation des cellules par une ou plusieurs sources laser, injection monodispersée de cellules dans le flux laminaire, analyse de la dispersion de la lumière (en ligne FSC et latéralement SSC) par des photodiodes. Capture de la fluorescence émise par les cellules marquées spécifiquement via les PMT après redirection et sélection des longueurs d'onde émises par des miroirs dichroïques et filtres.

URCACyt - Plateau technique de cytométrie en flux

Les marqueurs de surface principalement utilisés dans l'identification et la caractérisation des leucocytes en cytométrie en flux sont les molécules CD. Des anticorps spécifiques de ces marqueurs combinés à des fluorochromes permettent de réaliser l'immunophénotypage. Une combinaison de plusieurs marqueurs permet de différencier les populations lymphocytaires.

Dans le tableau suivant (Tableau 6) sont résumés les différents marqueurs cellulaires utilisés dans notre étude :

Antigène CD	Expression	Fonction
CD45	Leucocytes / cellules souches hématopoïétiques	
CD3	LT matures / thymocytes	Transduction du signal du TCR
CD4	LT CD4+ dont T helpers	Co-récepteur du TCR se liant au CMH-II
CD8	LT CD8+ dont T cytotoxiques	Co-récepteur du TCR se liant au CMH-I
CD25 Chaîne α du récepteur à l'IL-2	LT et LB activés LT régulateurs (Tregs)	Activation et prolifération des LT, LB, NK et macrophages Fonction immunosuppressive à taux élevé
CD127 Chaîne α du récepteur à l'IL-7	Thymocytes, LB immatures, LT matures	Nécessaire à la survie des LT (auto-renouvellement) Régulation négative de son expression lors de l'activation du LT
CD137 4-1BB : famille des récepteurs au TNF	LT et LB activés	Signal de co-stimulation pour la différenciation et la survie des LT effecteurs.
CD152 CTLA-4 (T-lymphocyte associated antigen 4) famille des récepteurs B7	LT régulateurs LT activés depuis plusieurs jours	Signal d'inhibition après liaison au CD80/CD86
CD160 Récepteur BY55 : superfamille des immunoglobulines	NK et LT activés	Liaison au CMH-I avec immunomodulation cellulaire
CD244 Récepteur 2B4	NK et LT CD8+	Liaison au ligand CD48 Co-récepteur avec une fonction de stimulation ou d'inhibition
CD279 PD-1 (programmed cell death 1)	LT activés	Récepteur inhibiteur Induction de la tolérance immunitaire

Tableau 6 : Principaux marqueurs cellulaires utilisés dans l'étude, cellules d'expression, fonctions

4) Marquage des échantillons

Les anticorps utilisés pour le marquage des lymphocytes ont été achetés auprès de deux fournisseurs : BD Biosciences et Beckman Coulter.

	FITC	PE	ECD	PerCP 5.5	PC7	APC / AA 647	AA 700	AA 750/ APC-H7	PB/ BV421	KO
Tubes										
T01	CD3	CD279		CD25	CD4	CD127		CD8	CD137	CD45
T02	CD3	CD160		CD244	CD4	CD279			CD152	CD45
T03	CD3				CD4			CD8		CD45

Tableau 7 : Tableau descriptif des combinaisons d'anticorps ciblant les marqueurs membranaires

Sont exposés en ligne les mix d'anticorps ciblant les marqueurs membranaires dans chaque tube (T01, T02, T03) et en colonne les fluorochromes utilisés pour chaque anticorps.

(FITC : fluorescein isothiocyanate / PE : phycoérythrine / ECD : Electron Coupled Dye / PerCP : peridinin chlorophyll protein / PC7 : phycoerythrin cyanin 7 / APC : allophycocyanin / AA : Alexa Fluor / APC-H7 : tandem APC-cyanin / PB : pacific blue / BV : brilliant violet / KO : krome orange)

Trois tubes ont été utilisés pour l'immunomarquage direct avec 100µL de sang total dans chacun des tubes et un volume de mix d'anticorps T01, T02 ou T03 dans chacun des tubes. Le tube 3 sert de témoin négatif et permet de visualiser la positivité des marqueurs dans les tubes 1 et 2. Le tube EDTA utilisé est le même que celui utilisé pour la numération T, B, NK afin de ne pas avoir de divergences sur le nombre de cellules /µL entre les deux analyses.

Les tubes ont ensuite été incubés 20 minutes à l'abri de la lumière afin que les anticorps marqués par un fluorochrome se fixent spécifiquement sur leur antigène à la surface des LT. 2 mL de tampon de lyse érythrocytaire (BD FACS Lysis™) ont ensuite été ajoutés. Après incubation 15 minutes à l'abri de la lumière, les tubes ont été centrifugés 5 minutes à 1500 tours/minute à 22°C. Après l'élimination du surnageant, un lavage des leucocytes par 2mL de PBS CellWash (BD Biosciences) dans chaque tube a été réalisé puis les tubes ont été remis à centrifuger 5 minutes à 1500 tours/minute à température ambiante. Le surnageant a ensuite été éliminé puis les cellules ont été remises en suspension dans 250µL de CellWash pour l'analyse au cytomètre.

5) Analyse par cytométrie en flux

L'analyse des échantillons par cytométrie en flux est réalisée dans l'heure qui suit le marquage des cellules.

Les échantillons marqués ont été analysés sur un cytomètre Navios (Beckman Coulter) 10 couleurs avec 3 lasers (405 nm, 40 mW ; 488 nm, 22 mW ; 638 nm, 25 mW).

Les données acquises ont ensuite été analysées et représentées grâce au logiciel Kaluza®.

6) Stratégie d'analyse

Rappel : l'objectif de l'étude était d'observer l'évolution quantitative et phénotypique des différentes sous-populations lymphocytaires T de patients en choc septique au cours des premiers jours d'hospitalisation en réanimation. Un objectif secondaire était de mettre en évidence des marqueurs biologiques et phénotypiques d'épuisement lymphocytaire potentiellement capables de déterminer une population de plus mauvais pronostic dans une cohorte de patients en choc septique.

Numération lymphocytes T, B et NK

La première étape était la numération T, B et NK qui consistait à déterminer les pourcentages des sous-populations lymphocytaires à l'aide de marqueurs membranaires spécifiques. Afin d'établir la valeur absolue, un étalon interne sous forme de billes fluorescentes était ajouté en quantité connue à l'échantillon. L'utilisation d'un volume fixe de sang total nous a alors permis de déterminer la concentration sanguine en lymphocytes.

Identification des populations lymphocytaires d'intérêt

Les lymphocytes ont premièrement été identifiés parmi les leucocytes par leur faible granularité relative (SSC) et une forte expression du CD45. Les lymphocytes T ont ensuite été sélectionnés grâce à l'expression du CD3 puis les populations de LT CD4+ et CD8+ ont été séparées (Figure 18).

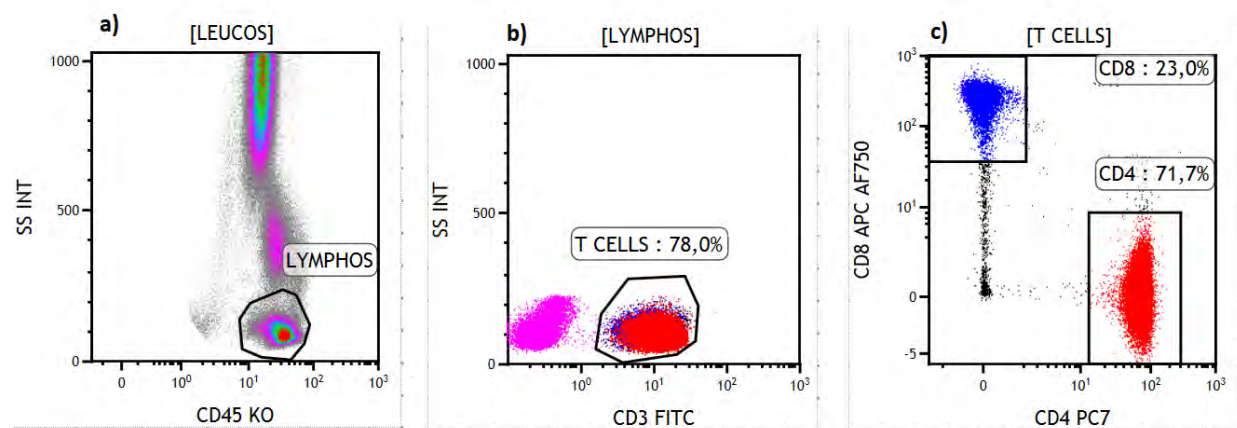


Figure 18 : Identification des lymphocytes T en CMF

- Identification des lymphocytes parmi les leucocytes : granularité (SSC) en fonction du CD45
- Identification des lymphocytes T CD3+
- Séparation des lymphocytes T CD4+ et T CD8+

Le tube 1 a permis l'identification des Tregs grâce à la forte expression du CD25 et l'expression faible du CD127 sur les LT CD4+ (Figure 19). Nous avons ensuite étudié l'expression de PD-1 (CD279), récepteur co-inhibiteur participant aux fonctions suppressives des Tregs (38).

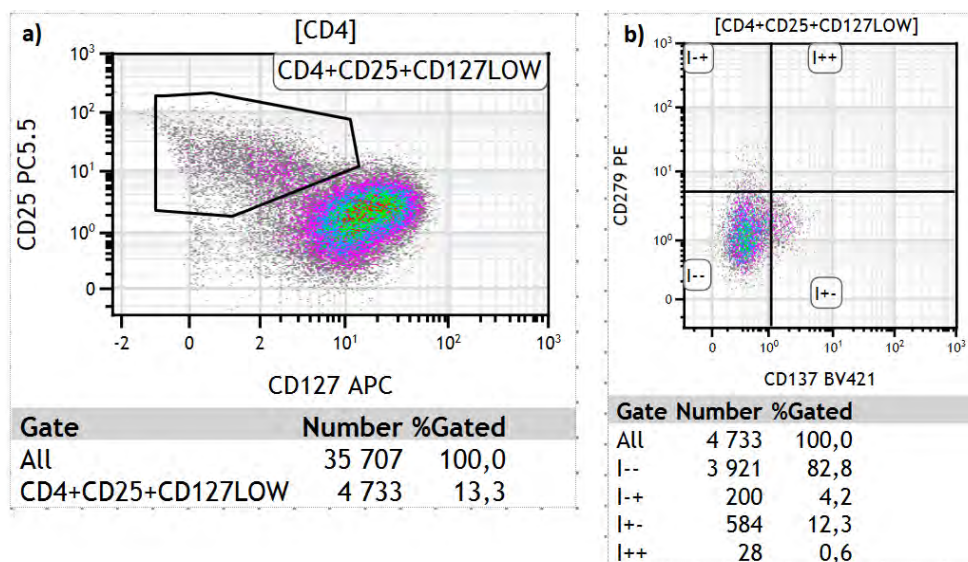


Figure 19 : Etude des Tregs en CMF

- a) Identification des Tregs CD3+ CD4+ CD25^{high} CD127^{low}
- b) Etude de l'expression du CD279 (PD-1) à la surface des Tregs

Le tube 2 nous a permis d'étudier l'expression d'immunes checkpoints à la surface des LT CD4+ et CD8+ dans le but d'observer le degré d'activation ou d'épuisement lymphocytaire (Figure 20) :

- **PD-1 (CD279)** : comme on l'a vu précédemment, dans des situations infectieuses (en particulier des infections virales chroniques) ou tumorales, PD-1 a été associé dans de nombreuses études à une perte des fonctions effectrices des lymphocytes T et à un épuisement lymphocytaire.
PD-1 est classiquement exprimé à la surface des LT effecteurs (après activation) et des LT épuisés (après interaction prolongée avec un pathogène). Il est naturellement peu exprimé à la surface des LT naïfs et des LT mémoires latents (en absence de pathogène) et donc peu exprimé chez les sujets sains (88)(108)(109).
- **2B4 (CD244)** : 2B4 est un ICP à vocation co-stimulatrice ou co-inhibitrice selon le contexte. Etudié le plus souvent dans des modèles de viroses chroniques ou de cancer, son expression associée à l'expression simultanée de plusieurs autres récepteurs co-inhibiteurs semble liée dans la plupart des études à des fonctions lymphocytaires altérées. Il est naturellement peu exprimé à la surface des LT naïfs mais est souvent exprimé à la surface des LT mémoires latents (en absence de pathogène) et peut donc être exprimé chez les sujets sains. Lors de l'activation lymphocytaire, son expression est accrue à la surface des LT effecteurs ainsi que sur les LT épuisés après interaction prolongée avec un antigène (91)(88)(110)(111).
- **CD160** : l'expression de CD160 semble être un marqueur indépendant de dysfonction lymphocytaire T et sa co-expression avec PD-1 semble désigner une sous-population de LT qui présente des signes d'épuisement avancés. Il est naturellement peu exprimé à la surface

des LT naïfs et des LT mémoires latents (en absence de pathogène) et donc peu exprimé chez les sujets sains. Il peut être exprimé à la surface des LT effecteurs (après activation) et des LT épuisés (après interaction prolongée avec un pathogène) (97)(88)(112).

- La co-expression de ces 3 ICPs semble associée à des signes avancés d'épuisement lymphocytaire (88)(113)(114).

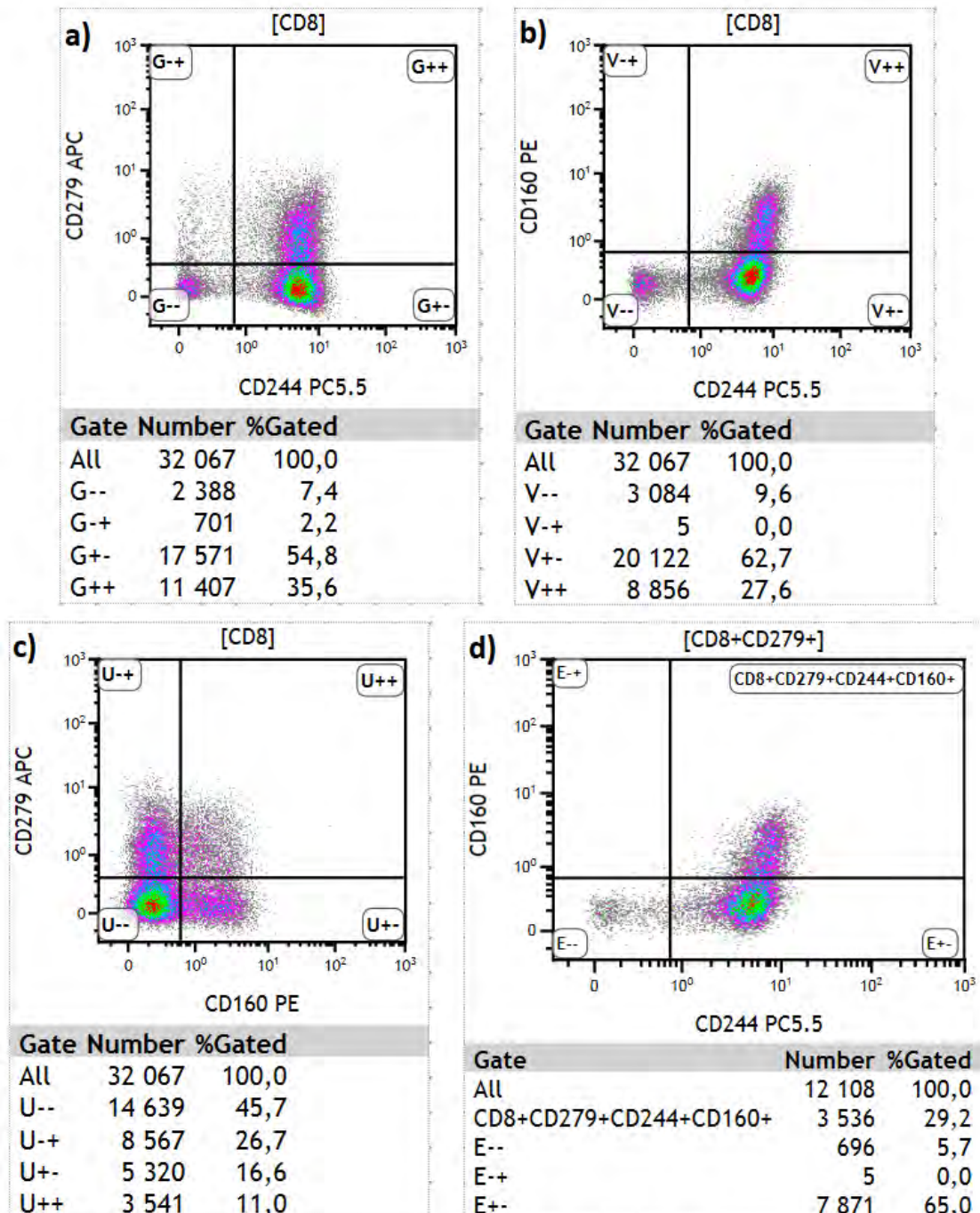


Figure 20 : Profil d'expression de marqueurs d'immunité en CMF sur les LT CD8+

- Représentation de la fluorescence relative du CD279 (PD-1) par rapport à celle du CD244 (2B4)
- Représentation de la fluorescence relative du CD160 par rapport à celle du CD244 (2B4)
- Représentation de la fluorescence relative du CD279 (PD-1) par rapport à celle du CD160
- Représentation de la fluorescence relative du CD160 par rapport à celle du CD244 (2B4) sur les lymphocytes T CD8+/PD-1+

Sur le tube 1, nous a aussi permis de différencier les LT non activés (LT naïfs et LT mémoires latents) des LT effecteurs activés (LT naïfs après activation et LT mémoire effecteur après nouveau contact avec l'antigène) (Figure 21).

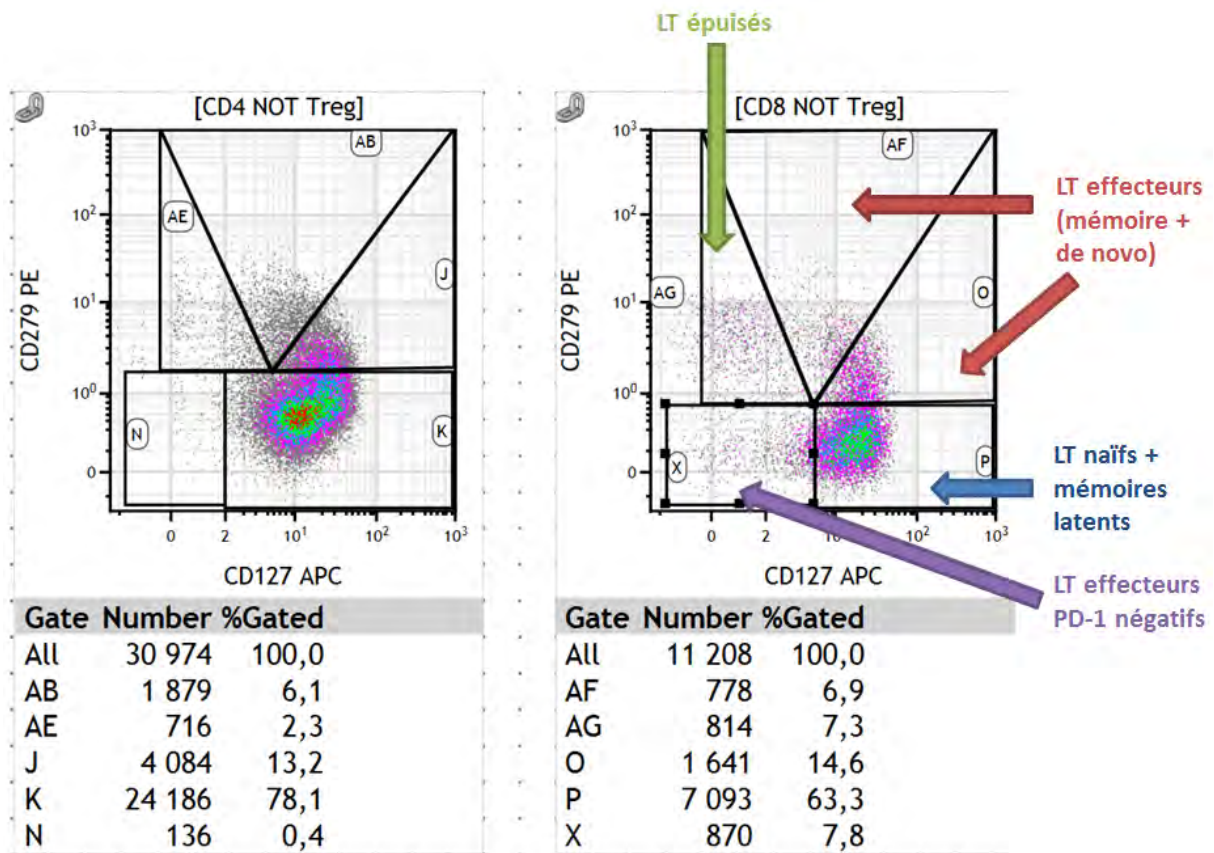


Figure 21 : Différentiation phénotypique entre les LT naïfs/mémoires latents et les LT effecteurs

Etude de l'expression de PD-1 (récepteur co-inhibiteur exprimé en période d'activation ou d'épuisement lymphocytaire) et du CD127 (récepteur de l'IL-7 : potentiel d'auto-renouvellement à la surface des LT CD4+ et CD8+ (non Tregs).

Les LT naïfs et mémoires latents étaient distingués par un fort potentiel d'auto-renouvellement (forte expression du CD127) et une absence d'activation (absence d'expression de PD-1) (**Flèche bleue**)

Les LT activés, mémoires effecteurs et effecteurs de novo, étaient distingués par un fort potentiel d'auto-renouvellement (forte expression du CD127) et une activation lymphocytaire (expression augmentée de PD-1).

(**Flèches rouges**)

Les LT activés peuvent ne pas exprimer PD-1 lors de leur activation et exprimer éventuellement d'autres ICPS. Nous pouvons les différencier des LT naïfs/mémoire latents par leur absence d'expression de CD127. (**Flèche violette**)

Les LT épuisés ont perdu leur potentiel d'auto-renouvellement (absence d'expression du CD127) et une forte expression du récepteur co-inhibiteur PD-1. (**Flèche verte**)

Chez le sujet sain, la population de LT circulants est majoritairement composée de LT naïfs (n'ayant jamais été en contact avec un antigène) et de LT mémoires latents (54). Ces deux populations, en dehors de tout contact avec un antigène, expriment peu PD-1 (immune checkpoint à vocation co-inhibitrice pouvant être exprimé lors de l'activation ou de l'épuisement lymphocytaire). Elles possèdent toutes deux, un fort potentiel d'auto-renouvellement marqué par l'expression de CD127 (récepteur de l'IL-7).

Chez un sujet infecté, l'activation lymphocytaire concerne à la fois les LT naïfs et les LT mémoires latents qui après activation composeront la population de LT effecteurs : LT mémoires effecteurs + LT effecteurs de novo. Parallèlement à leur activation, PD-1 sera exprimé progressivement à la surface des LT.

Les LT activés peuvent très bien ne pas exprimer PD-1 lors de leur activation et exprimer éventuellement d'autres ICPs. Nous pouvons les différencier des LT naïfs/mémoire latents par leur absence d'expression de CD127.

Après un contact prolongé avec le pathogène, les lymphocytes peuvent entrer dans un état d'épuisement lymphocytaire marqué par la perte progressive du potentiel d'auto-renouvellement (perte de l'expression du CD127) et une forte expression de PD-1 (115).

Pour l'étude statistique, nous avons simplement tenu compte de la différence entre les LT qui n'ont pas opéré la moindre activation (naïfs + mémoires latents) et les lymphocytes activés quel que soit leur état d'activation (LT effecteurs + épuisés + effecteurs PD-1 négatifs). Pour obtenir le nombre de lymphocytes T effecteurs activés nous avons soustrait le nombre de LT naïfs/mémoire latents au nombre de LT (non Tregs) total.

7) Analyse statistique

Le test statistique utilisé pour traiter la grande majorité des données était le test de Wilcoxon-Mann-Whitney au risque de 5%.

Le Wilcoxon matched pairs test au risque de 5% a été utilisé pour l'analyse de l'évolution des paramètres au cours du temps.

Partie 3 : Résultats

Rappel : l'objectif de l'étude est d'établir des profils immunitaires de patients en choc septique en analysant l'évolution quantitative et phénotypique des différentes sous-populations lymphocytaires T au cours des premiers jours d'hospitalisation en réanimation. L'objectif secondaire est de mettre en évidence des marqueurs biologiques et phénotypiques d'épuisement lymphocytaire potentiellement capables de déterminer une population de plus mauvais pronostic dans une cohorte de patients en choc septique.

1) L'augmentation du nombre de lymphocytes T CD4+ au cours du sepsis est de bon pronostic

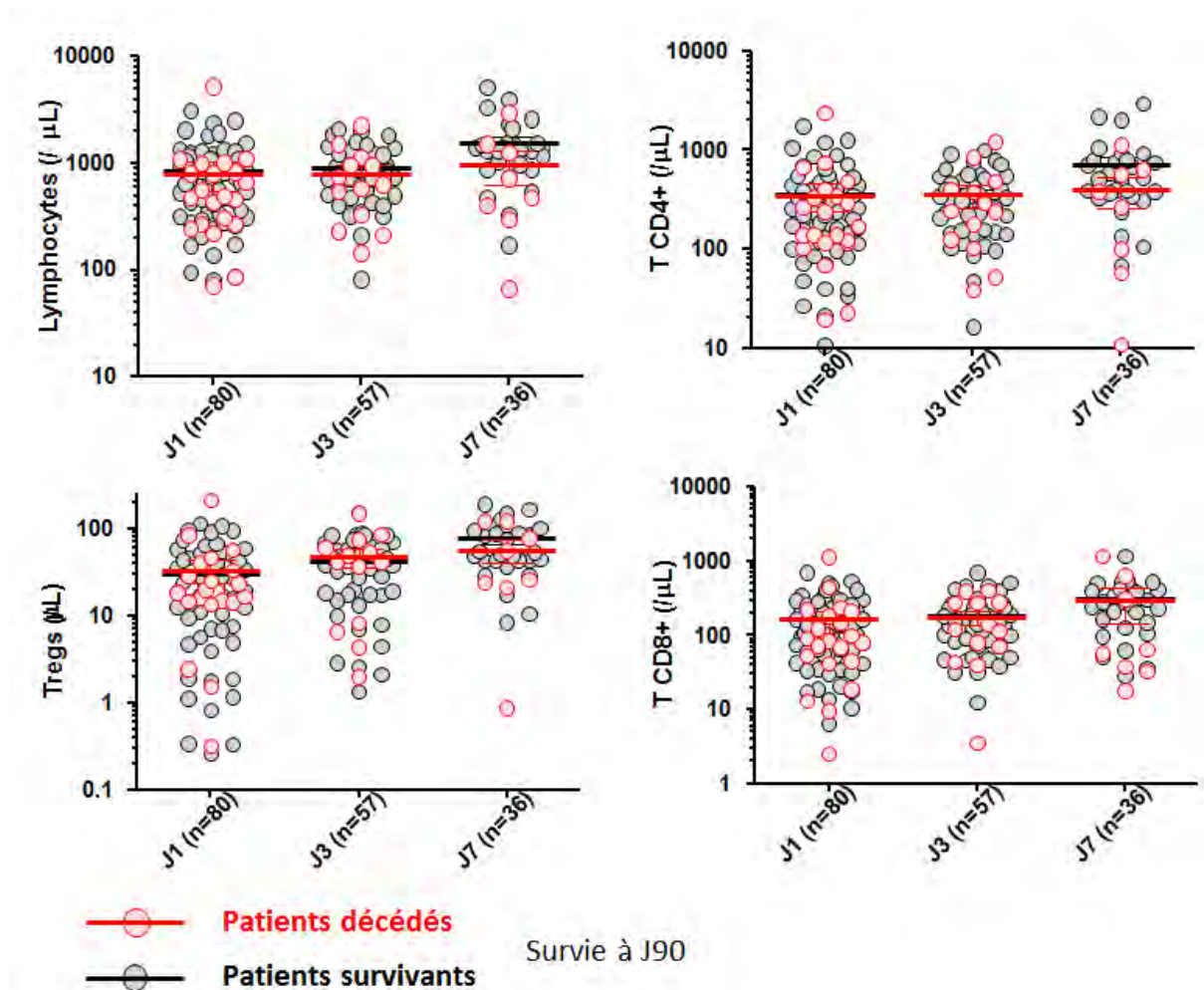


Figure 22 : Evolution du nombre (valeur absolue) de lymphocytes totaux, de LT CD4+ et CD8+ et des Tregs au cours des premiers jours du sepsis.

Les effectifs disponibles pour l'étude de l'évolution des principaux paramètres étaient de :

- 80 patients à J1 (69 survivants et 21 décédés à J90)
- 57 patients à J3 (44 survivants et 13 décédés à J90)
- 36 patients à J7 (28 survivants et 8 décédés à J90)

La majorité des patients de notre cohorte présente une lymphopénie au moment du diagnostic (90% <1500 lymphocytes/ μ L, 70% <1000 lymphocytes/ μ L, 41% <500 lymphocytes/ μ L), qui se caractérise par un faible nombre de lymphocytes T CD8+ (moyenne=164/ μ L) et un ratio CD4/CD8 augmenté (moyenne=3). Le nombre moyen de Tregs est de 30.9/ μ L mais présente une grande hétérogénéité au sein de la cohorte (écart-type=33.6).

Pour ces 4 paramètres (lymphocytose, T CD4+, T CD8+ et Tregs), il n'a pas été observé de différence significative entre les patients survivants et les patients décédés à J90.

On note toutefois une augmentation du nombre absolu de lymphocytes circulant entre J1 (moyenne=820/ μ L) et J7 (moyenne=1423/ μ L) ($p < 0.0001$, Wilcoxon matched pairs test); plus particulièrement chez les patients survivants (à J1 moyenne=833/ μ L et à J7 moyenne=1554/ μ L, $p = 0.0005$) que chez les patients décédés (à J1 moyenne=784/ μ L et à J7 moyenne=966/ μ L, $p = 0.08$).

L'augmentation du nombre absolu de LT CD4+ entre J1 (moyenne=349/ μ L) et J7 (moyenne=647/ μ L, $p = 0.0002$) est plus particulièrement prononcé chez les patients survivants (à J1 moyenne=350/ μ L et à J7 moyenne=720/ μ L, $p = 0.0011$) que chez les patients décédés (à J1 moyenne=347/ μ L et à J7 moyenne=394/ μ L, $p = 0.19$).

L'absence de modification du nombre de LT CD8+ au cours des 7 premiers jours du sepsis est surprenante. Il est possible que le ratio naïf/effecteur des T CD8+ évolue au cours du sepsis sans pour autant que cela n'impacte la valeur absolue de la population. Nous avons donc regardé le nombre de LT CD8+effecteurs au cours du sepsis.

Non représentée sur la Figure 22, nous observons une tendance à l'augmentation du pourcentage de Tregs/LT CD4+ (en moyenne : 9.8% à J1, 12.6% à J3 et 14.3% à J7). Cette tendance à l'augmentation semble concerner plus particulièrement les patients décédés (en moyenne : 10.3% à J1, 13.6% à J3 et 18.7% à J7) que les patients survivants à J90 (en moyenne : 9.3% à J1, 12.3% à J3 et 13.1% à J7).

2) Les LT effecteurs CD8+ sont augmentés chez les patients qui évoluent péjorativement

Pour l'étude, les lymphocytes T effecteurs ont été définis comme exprimant PD-1 (CD279) et/ou perdant l'expression de l'IL-7R (CD127), nécessaire pour l'auto-renouvellement des lymphocytes T (Figures 23, 24 et 25).

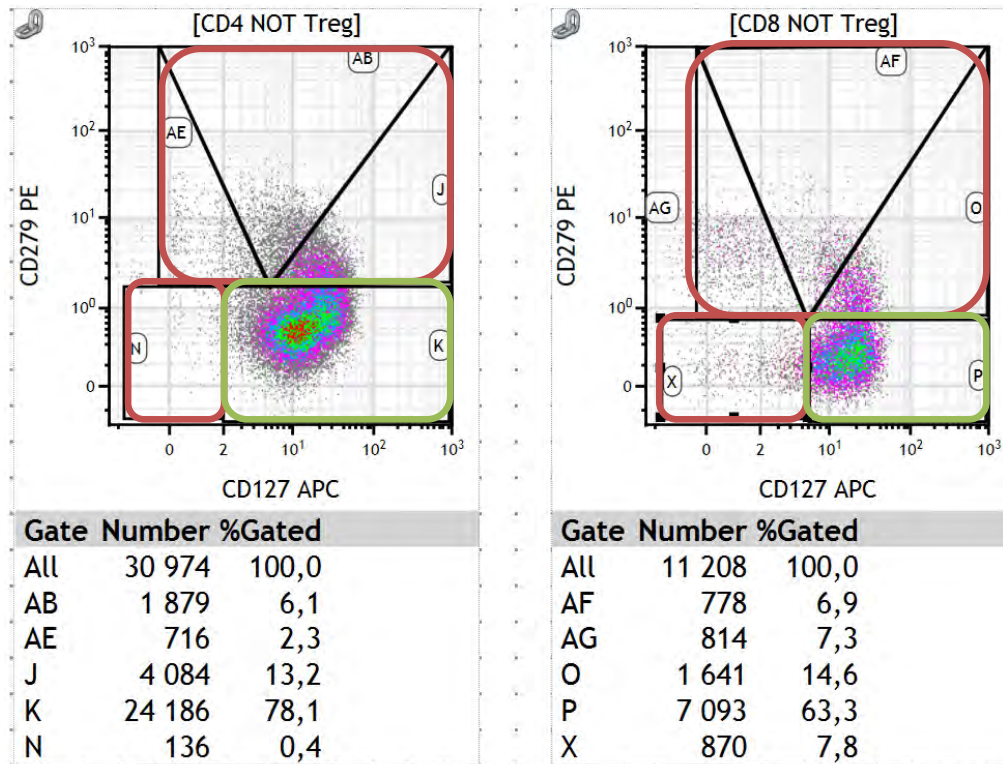


Figure 23 : LT effecteurs : exemple d'histogramme 1

Patient présentant beaucoup de LT naïfs et mémoires latents (rectangle vert) et peu de LT effecteurs (rectangles rouges) que ça soit sur les LT CD4+ ou CD8+

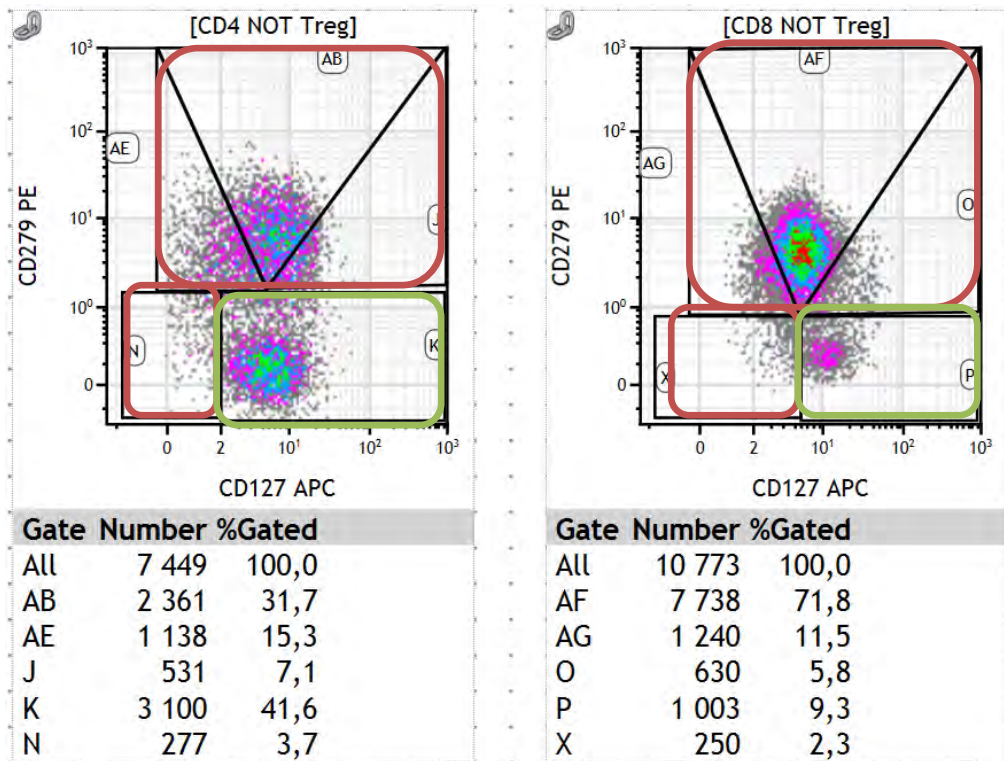


Figure 24 : LT effecteurs : exemple d'histogramme 2

Patient présentant peu de LT naïfs et mémoires latents (rectangle vert) et beaucoup de LT effecteurs (rectangles rouges) que ça soit sur les LT CD4+ ou CD8+

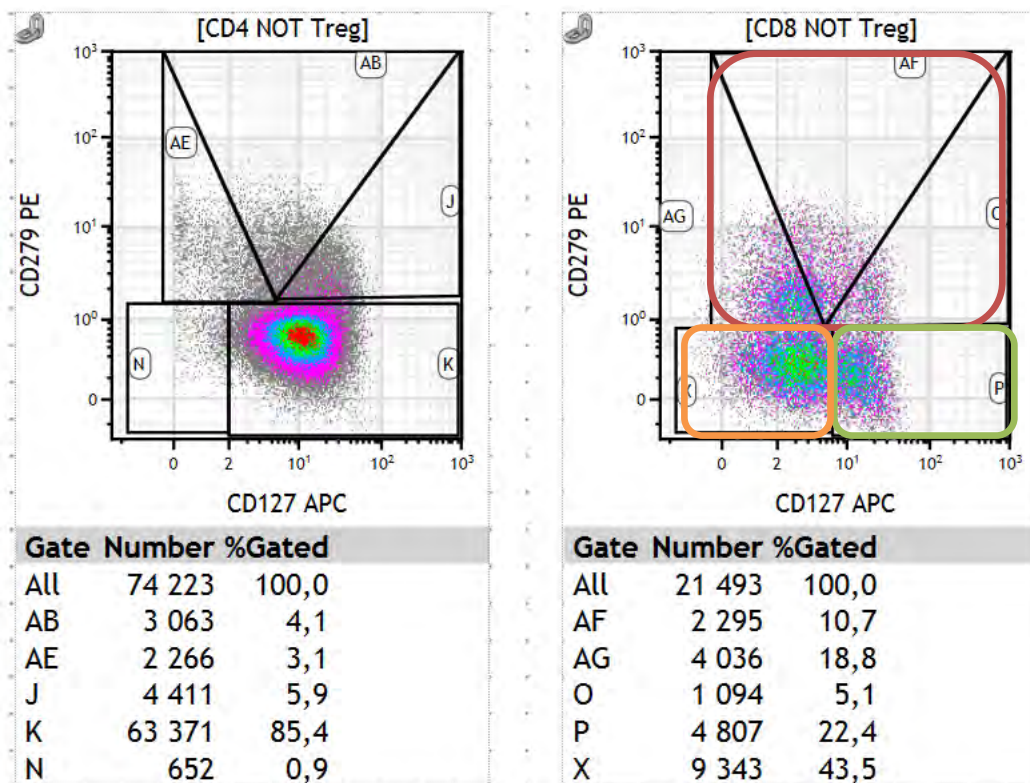


Figure 25 : LT effecteurs : exemple d'histogramme 3

Patient présentant peu de LT CD8+ naïfs et mémoires latents (rectangle vert) et beaucoup de LT CD8+ effecteurs : beaucoup de LT CD8+ effecteurs PD-1 négatifs (rectangle orange) et peu d'effecteurs PD-1+ (rectangle rouge)

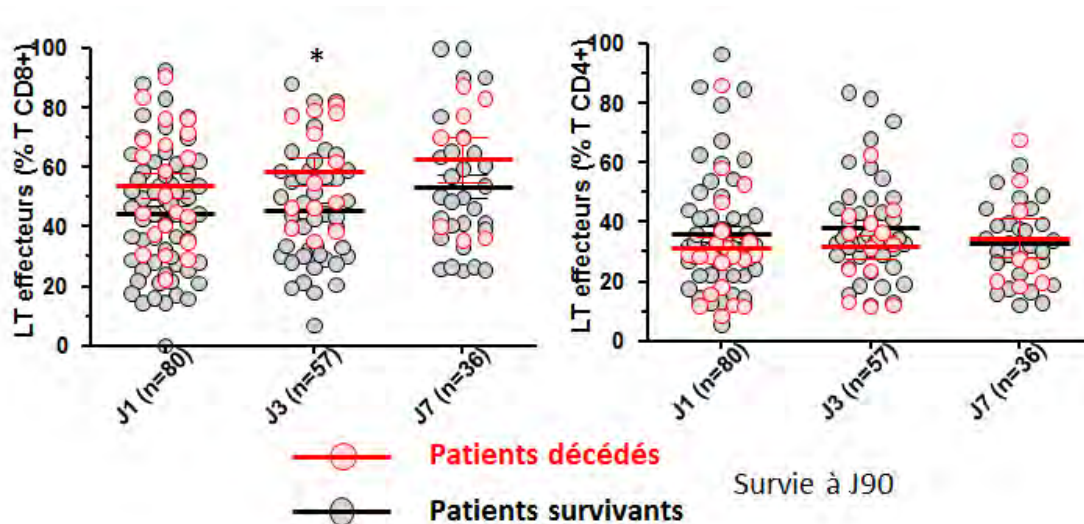


Figure 26 : Evolution du pourcentage de LT effecteurs CD4+ et CD8+ au cours des premiers jours du sepsis

Nous observons en moyenne 47% de LT CD8+ effecteurs à J1, 48% à J3 et 56% à J7. Les patients décédés à J90 présentent en moyenne plus de LT CD8+ effecteurs (54% à J1, 58% à J3 et 63% à J7) que les patients survivants à J90 (45% à J1, 46% à J3 et 53% à J7). Cette différence n'est cependant significative qu'à J3 ($p=0.04$). A J1 et J7 on observe la même tendance, mais sans significativité statistique ($p > 0.05$).

Nous observons en moyenne 35% de LT CD4+ effecteurs à J1, 37% à J3 et 33% à J7. Concernant le pourcentage de LT CD4+ effecteurs, nous n'observons aucune différence significative à J1, J3 ou J7 entre les patients décédés et survivants à J90.

L'augmentation du nombre d'effecteur T CD8+ chez les patients qui ne survivent pas après le choc septique fait poser la question de l'efficacité des populations lymphocytaires effectrices et donc de leur épuisement. Nous avons donc regardé l'expression de 3 marqueurs d'épuisement (immune checkpoints) sur les populations T CD8+ et T CD4+.

3) Expression d'immunes checkpoints sur les LT CD8+

3) a) Evolution du pourcentage de LT CD8+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 au cours des premiers jours du sepsis

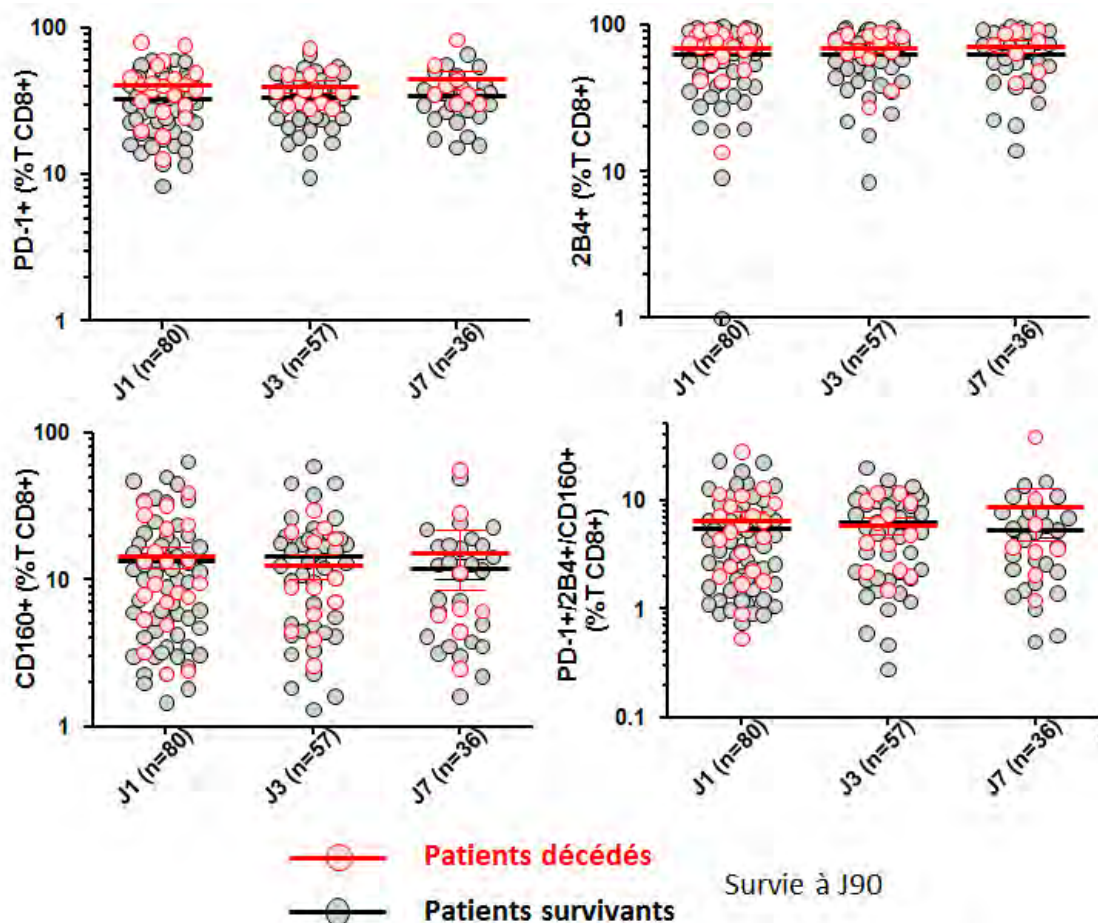


Figure 27 : Evolution du pourcentage de LT CD8+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 au cours des premiers jours du sepsis

Les ICPs PD-1, 2B4 et CD160 sont respectivement exprimés par 35%, 65% et 14% des lymphocytes T CD8+ au moment du diagnostic. Ces valeurs varient peu au cours de la première semaine (respectivement 36%, 65% et 13% à J7).

L'ICP le plus fréquemment exprimé à la surface des LT CD8+ est 2B4, puis PD-1 et enfin CD160.

Le pourcentage de LT CD8+ exprimant les 3 ICPs étudiés ne montre pas d'évolution significative au cours des 7 premiers jours du sepsis (5.8% à J1 et 6.0% à J7, $p=0.7$).

Concernant ces paramètres (pourcentage de LT CD8+ exprimant PD-1 ou 2B4 ou CD160 ou les trois simultanément), il n'a pas été observé de différence significative entre les patients survivants et les patients décédés à J90.

Néanmoins, le pourcentage de LT CD8+ exprimant PD-1 a tendance à être plus élevé pour les patients décédés à J90 que pour les patients survivants (respectivement 41% et 33% à J1, $p=0.08$; 45% et 34% à J7, $p=0.12$).

3) b) Profils d'acquisition des immune checkpoints sur les LT CD8+

Aucune différence significative n'ayant été mise en évidence en étudiant l'expression isolée d'immune checkpoints, nous avons décidé d'étudier leurs différents profils d'acquisition.

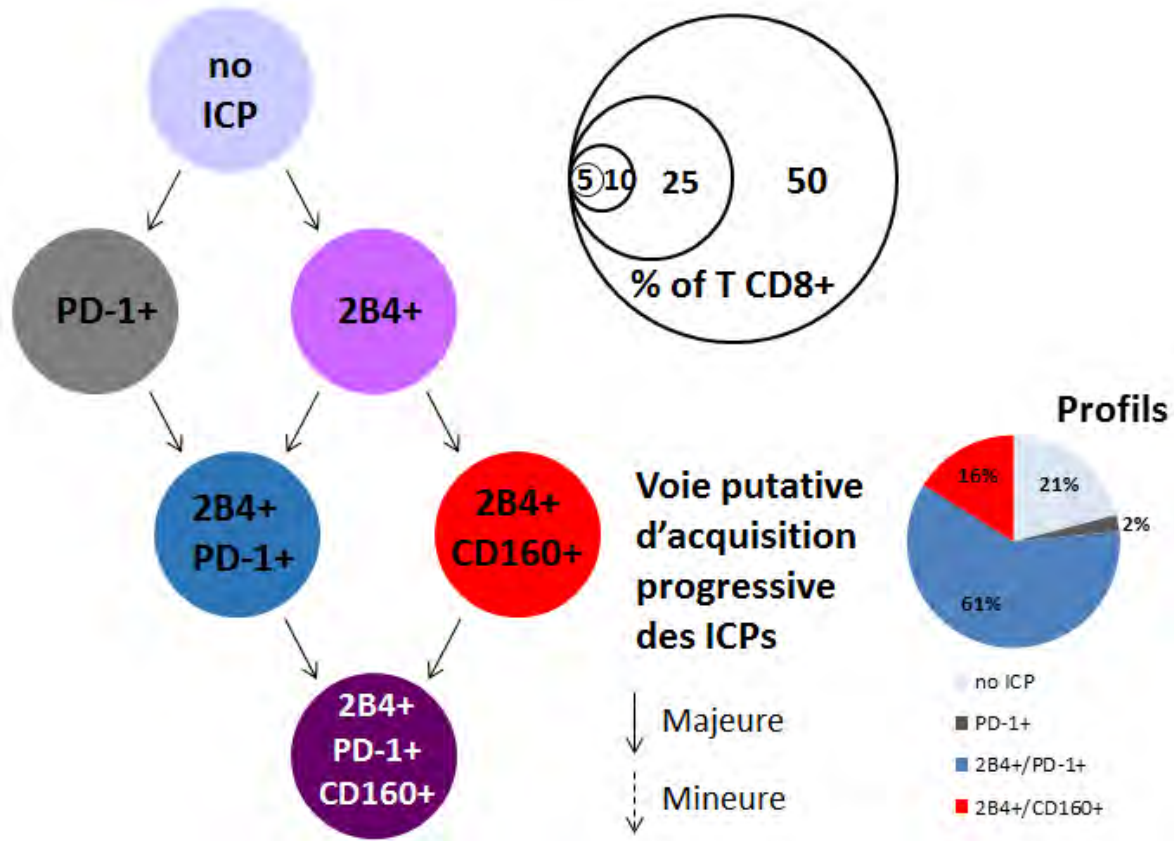


Figure 28 : Profils d'acquisition des immune checkpoints sur les LT CD8+

Nous avons émis l'hypothèse que les ICPs sont exprimés de façon séquentielle et hiérarchique puis conservés par les lymphocytes au cours du sepsis. En respectant ce principe, nous avons dressé le chemin d'acquisition le plus probable des marqueurs d'épuisement pour chaque patient.

Dans notre cohorte, 4 principaux profils d'acquisition d'ICPs par les LT CD8+ ont été observés. L'acquisition initiale d'ICPs se fait soit par l'expression de 2B4, soit de PD-1. Les LT CD8+/2B4+ peuvent ensuite exprimer soit PD-1 ou soit CD160. Les LT CD8+/PD-1+ acquièrent de leur côté 2B4 en priorité puis éventuellement CD160. Les 4 principaux profils observés étaient définis selon :

- La présence majoritaire (>50%) de lymphocytes T CD8+ n'exprimant aucun ICP : profil no ICP qui concerne 17 patients
- L'expression de PD-1 comme 1^{er} ICP : profil PD-1+ observé chez 2 patients
- L'expression majoritaire de 2B4 comme 1^{er} ICP puis de PD-1 : profil 2B4+/PD-1+ que l'on retrouve chez 49 patients
- L'expression majoritaire de 2B4 comme 1^{er} ICP puis de CD160 : profil 2B4+/CD160+ présent chez 12 patients

3) c) Profil no ICP

17 patients sur 80.

Survie à 28 jours : 88%

Survie à 90 jours : 88%

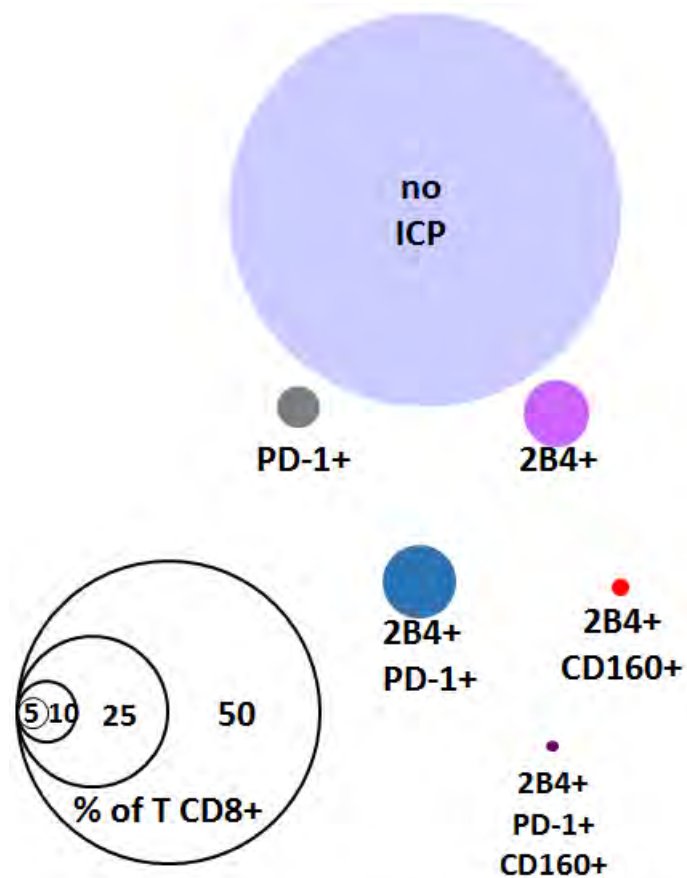


Figure 29 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD8+ n'exprimant aucun des ICPs étudiés : profil no ICP

17 patients présentent une majorité (> 50%) de LT CD8+ n'exprimant aucun des ICPs étudiés.

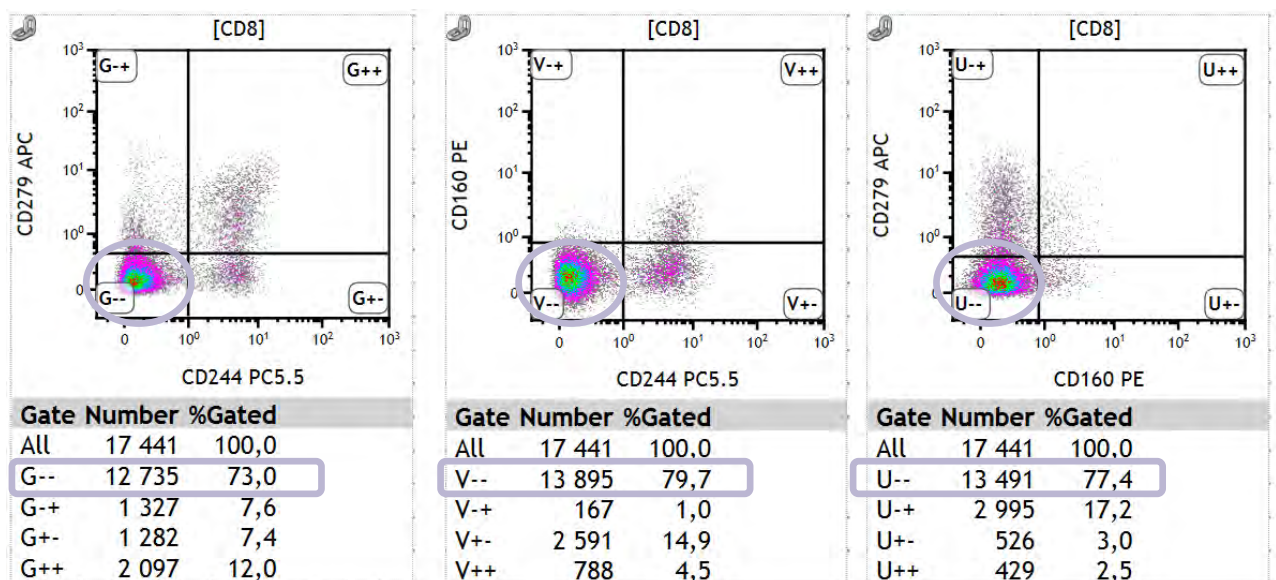


Figure 30 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD8+ majoritairement sans ICP.
CD279 = PD-1 / CD244 = 2B4

3) d) Profil PD-1+

2 patients sur 80.

Survie à 28 jours : 0 %

Survie à 90 jours : 0 %

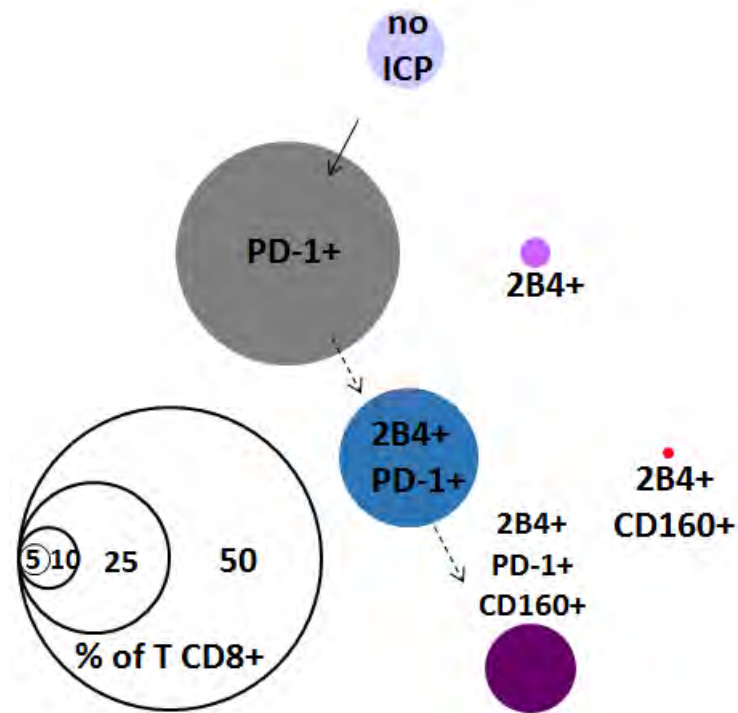


Figure 31 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD8+ exprimant prioritairement PD-1 : profil PD-1+

2 patients présentent une majorité de LT CD8+ exprimant prioritairement PD-1.

Pour ces rares patients, la voie d'expression des ICPs passe prioritairement par l'expression de PD-1. L'expression de 2B4 semble être majoritairement dépendante d'une expression initiale de PD-1 (Figure 32).

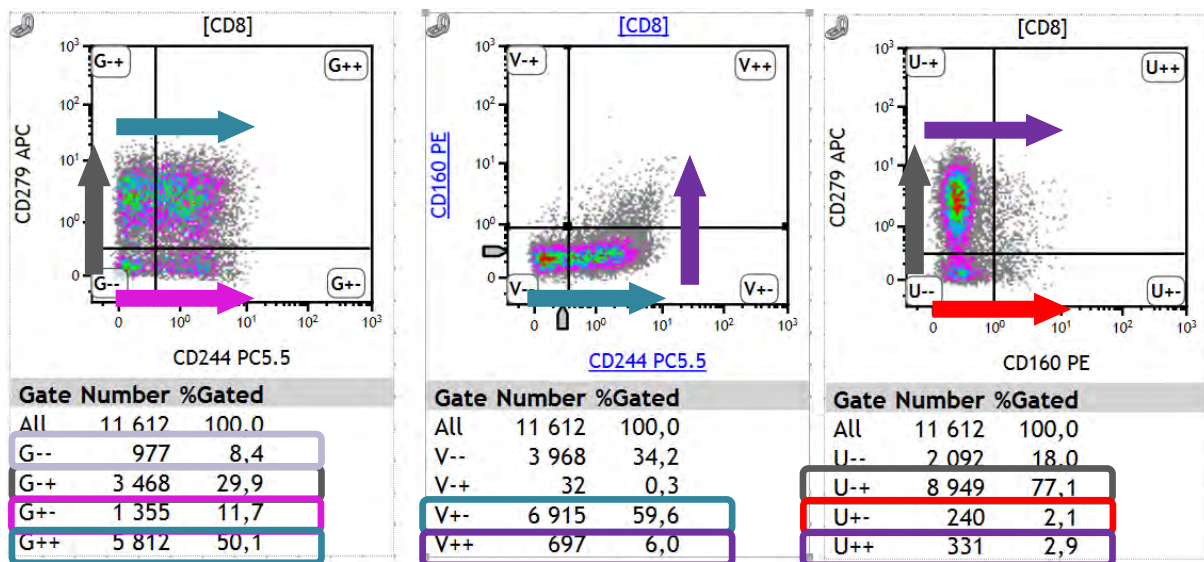


Figure 32 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD8+ prioritairement PD-1+

(Gris : acquisition de PD-1 / bleu-vert : acquisition de 2B4 via PD-1 / rose : acquisition de 2B4 seul / violet : acquisition de CD160 via 2B4 ou PD-1 / rouge : acquisition de CD160) CD279 = PD-1 / CD244 = 2B4

3) e) Profil 2B4+/PD-1+

49 patients sur 80.

Survie à 28 jours : 76 %

Survie à 90 jours : 68 %

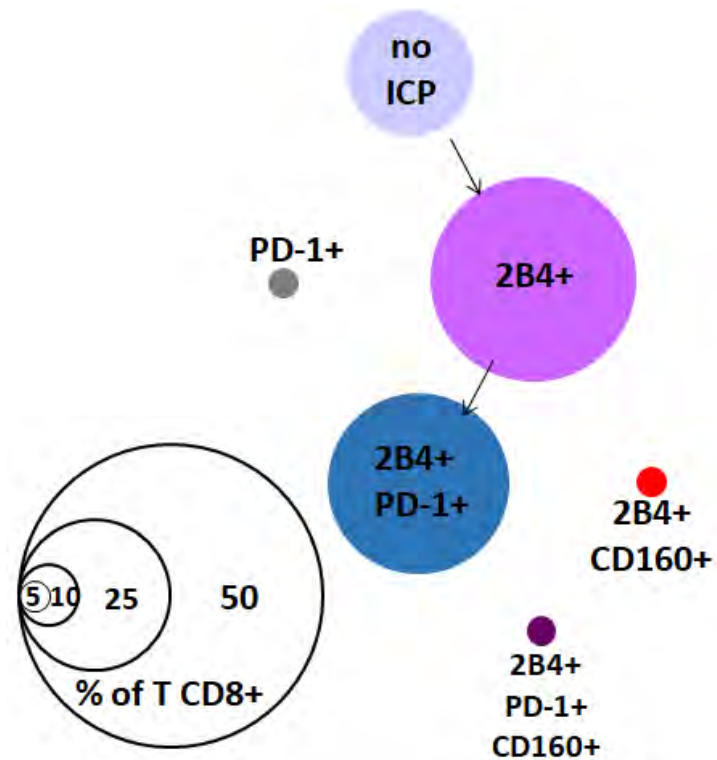


Figure 33 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD8+ exprimant d'abord 2B4 puis PD-1 : profil 2B4+/PD-1+

49 patients présentent une majorité de LT CD8+ exprimant 2B4 puis PD-1. Pour ces patients, la voie d'expression des ICPs passe prioritairement par l'expression de 2B4. L'expression de PD-1 semble être dépendante d'une expression initiale de 2B4. L'expression de CD160 est minoritaire (Figure 34).

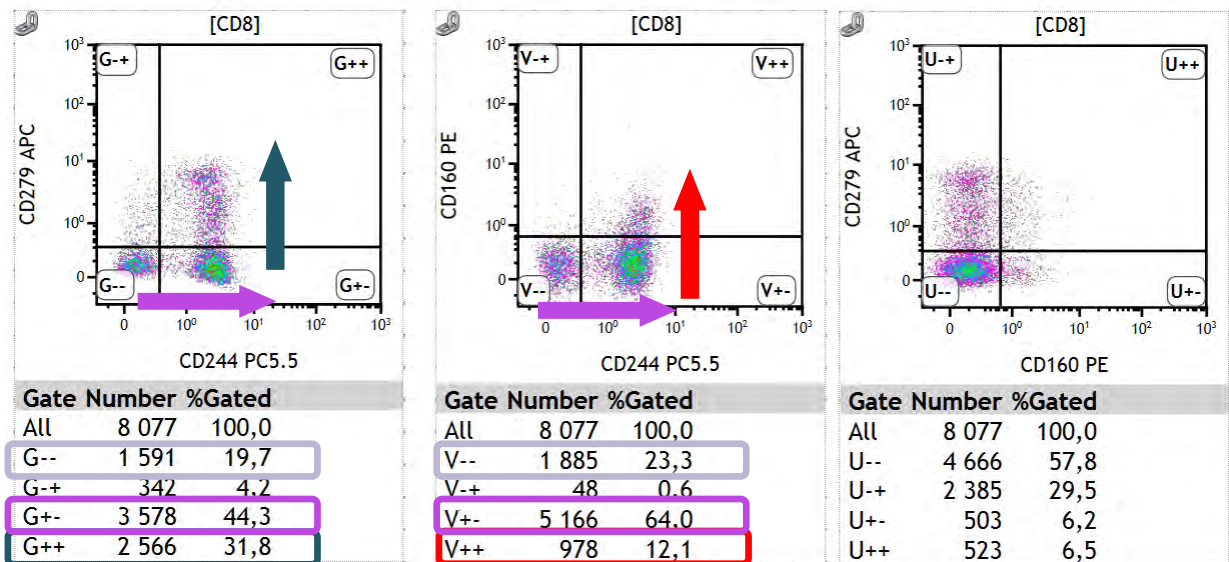


Figure 34 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD8+ majoritairement 2B4+/PD-1+ (rose : acquisition de 2B4 / bleu-vert : acquisition de PD-1 via 2B4 / rouge : acquisition de CD160 via 2B4)
CD279 = PD-1 / CD244 = 2B4

3) f) Profil 2B4+/CD160+

12 patients sur 80.

Survie à 28 jours : 92 %

Survie à 90 jours : 83 %

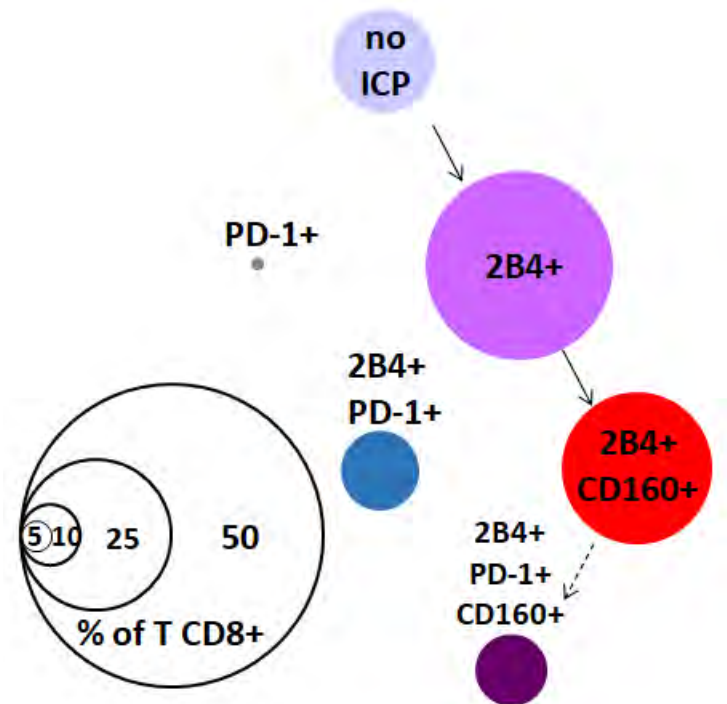


Figure 35 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD8+ exprimant d'abord 2B4 puis CD160: profil 2B4+/CD160+

12 patients présentent une majorité de LT CD8+ exprimant d'abord 2B4 puis CD160. Pour ces patients, la voie d'expression des ICPs passe prioritairement par l'expression de 2B4. L'expression de CD160, semble être dépendante d'une expression initiale de 2B4 mais indépendante d'une expression initiale de PD-1. L'expression de PD-1, minoritaire, semble être dépendante d'une expression initiale de 2B4 (Figure 36).

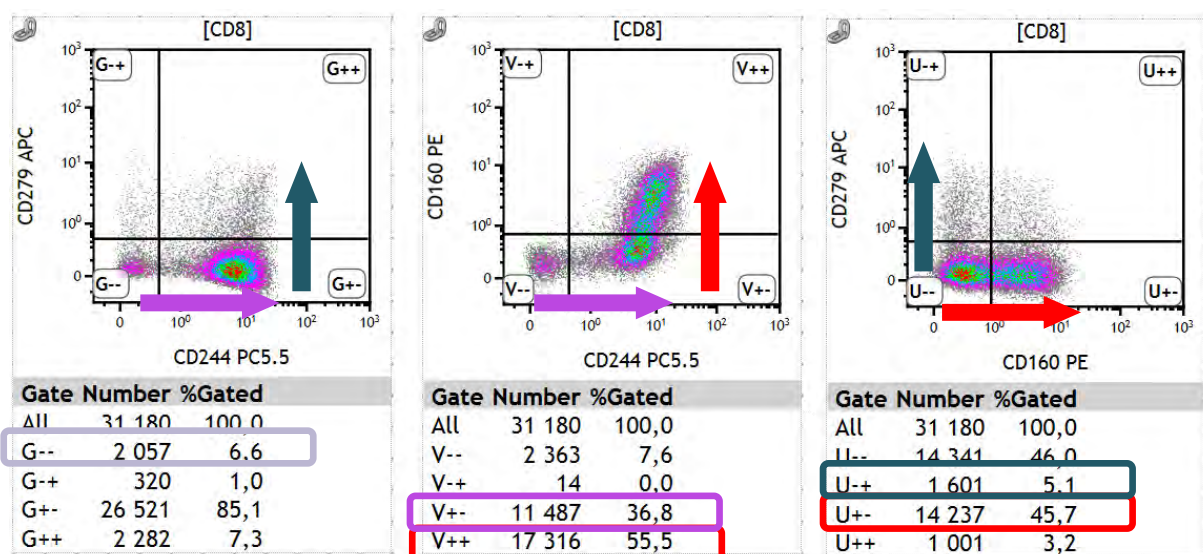


Figure 36 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD8+ majoritairement 2B4+/CD160+ (rose : acquisition de 2B4 / bleu-vert : acquisition de PD-1 via 2B4 / rouge : acquisition de CD160 via 2B4)

CD279 = PD-1 / CD244 = 2B4

3) g) Comparaison des profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+ vis-à-vis de l'âge, du nombre de lymphocytes, de LT, de Tregs et du rapport CD4+/CD8+

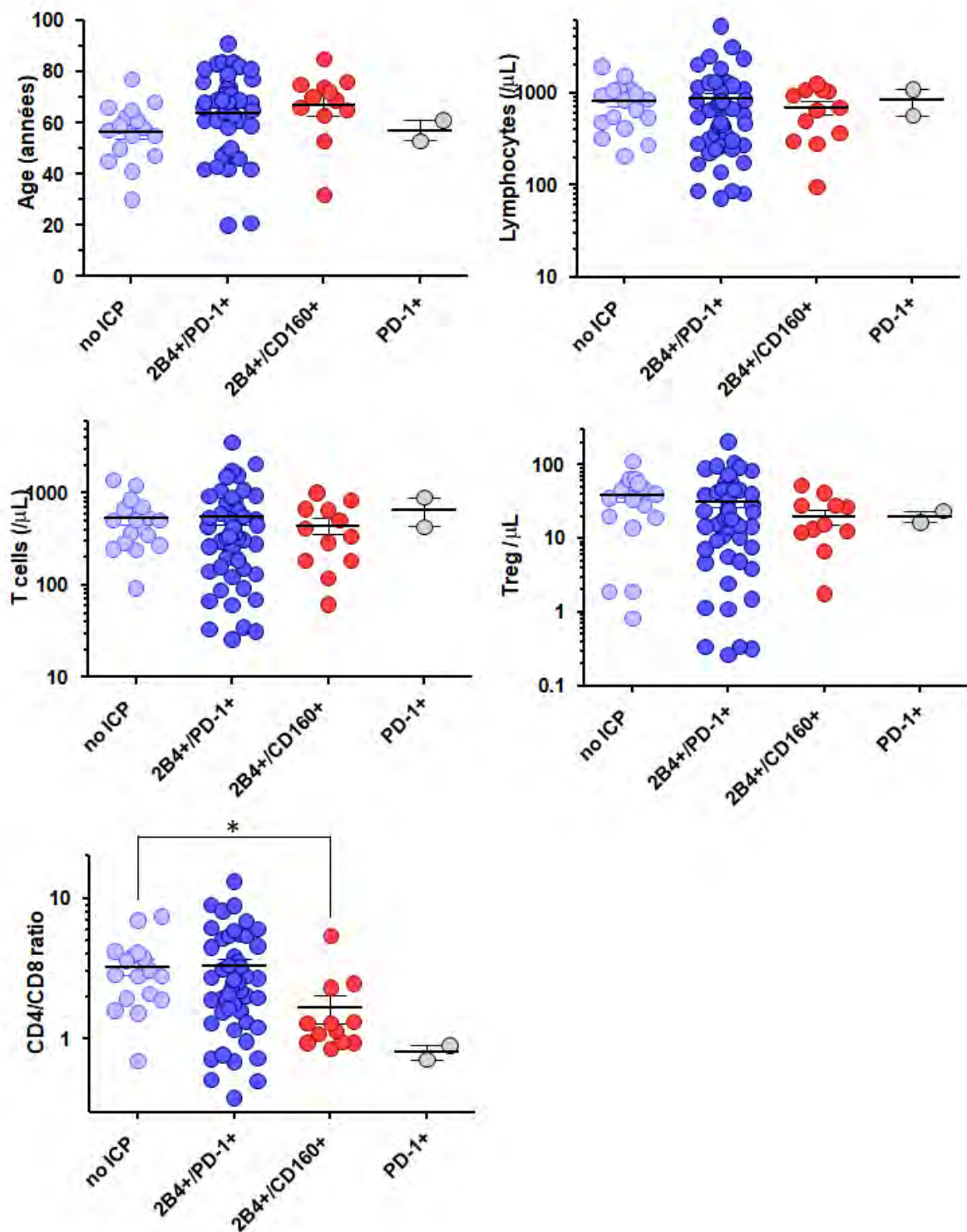


Figure 37 : Comparaison des profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+ vis-à-vis de l'âge, du nombre de lymphocytes, de LT, de Tregs et du rapport CD4+/CD8+

Les différents profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+ sont indépendants de l'âge des patients, de la lymphocytose totale ou de la lymphocytose T ainsi que du nombre de Treg (Figure 37).

Concernant le ratio CD4+/CD8+, nous observons une différence significative ($p=0.004$) entre le profil no ICP et le profil 2B4+/CD160+ mais pas de différence significative entre les autres profils. Le ratio CD4+/CD8+ est significativement plus élevé pour les patients au profil no ICP que pour les patients au profil 2B4+/CD160+.

4) Expression d'immunes checkpoints sur les LT CD4+

4) a) Evolution du pourcentage de LT CD4+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 au cours des premiers jours du sepsis

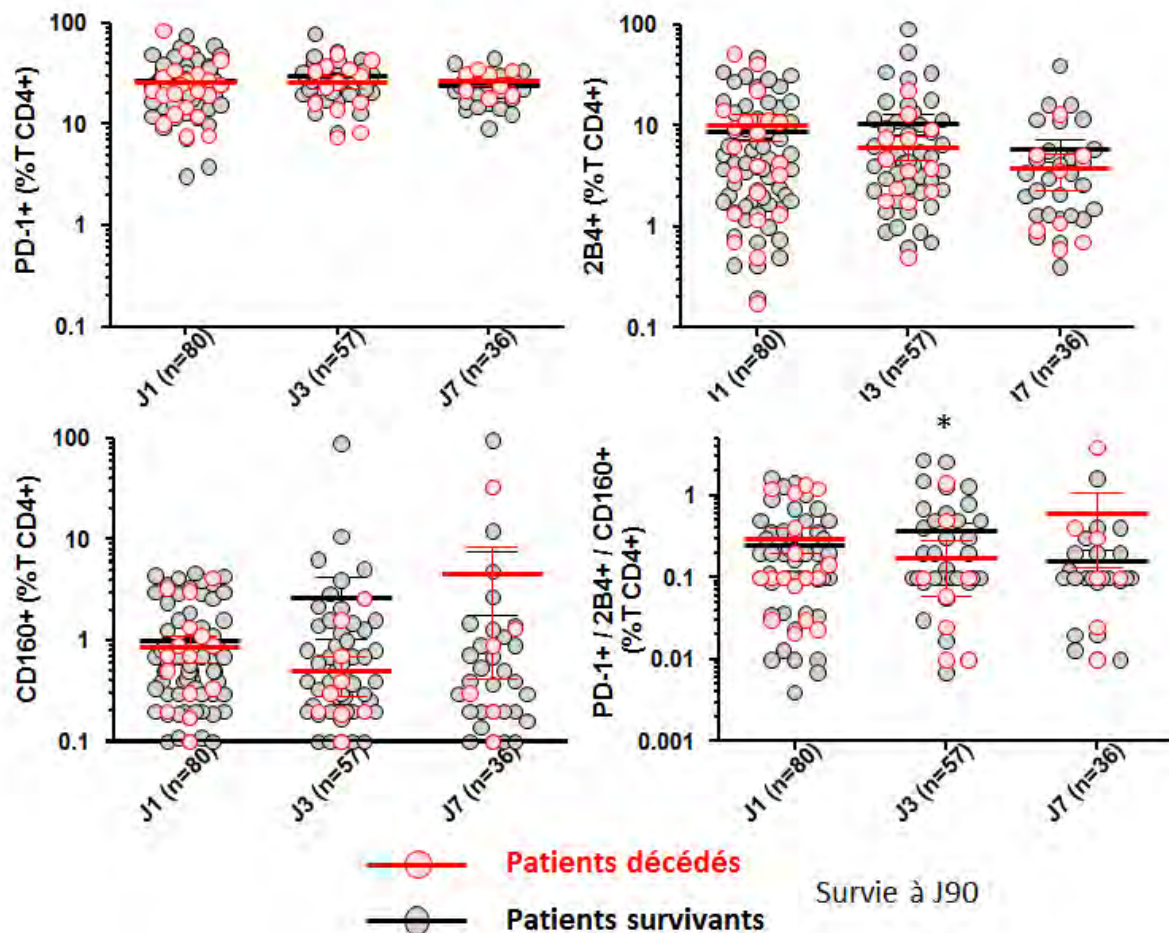


Figure 38 : Evolution du pourcentage de LT CD4+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 au cours des premiers jours du sepsis

Les ICP PD-1, 2B4 et CD160 sont respectivement exprimés par 27%, 9% et 1% des lymphocytes T CD4+ au moment du diagnostic. Ces valeurs varient peu au cours de la première semaine (respectivement 25%, 5% et 5% à J7).

L'ICP le plus fréquemment exprimé à la surface des LT CD4+ est PD-1, puis 2B4 et enfin CD160.

Le pourcentage de LT CD4+ exprimant les 3 ICPs étudiés ne montre pas d'évolution significative au cours des 7 premiers jours du sepsis (0.3% à J1 et 0.3% à J7).

Concernant ces paramètres (pourcentage de LT CD4+ exprimant PD-1 ou 2B4 ou CD160 ou les trois simultanément), il n'a pas été observé de différence significative entre les patients survivants et les patients décédés à J90.

4) b) Profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+

Aucune différence significative n'ayant été mise en évidence en étudiant l'expression isolée d'immunes checkpoints, nous avons décidé d'étudier leurs différents profils d'acquisition.

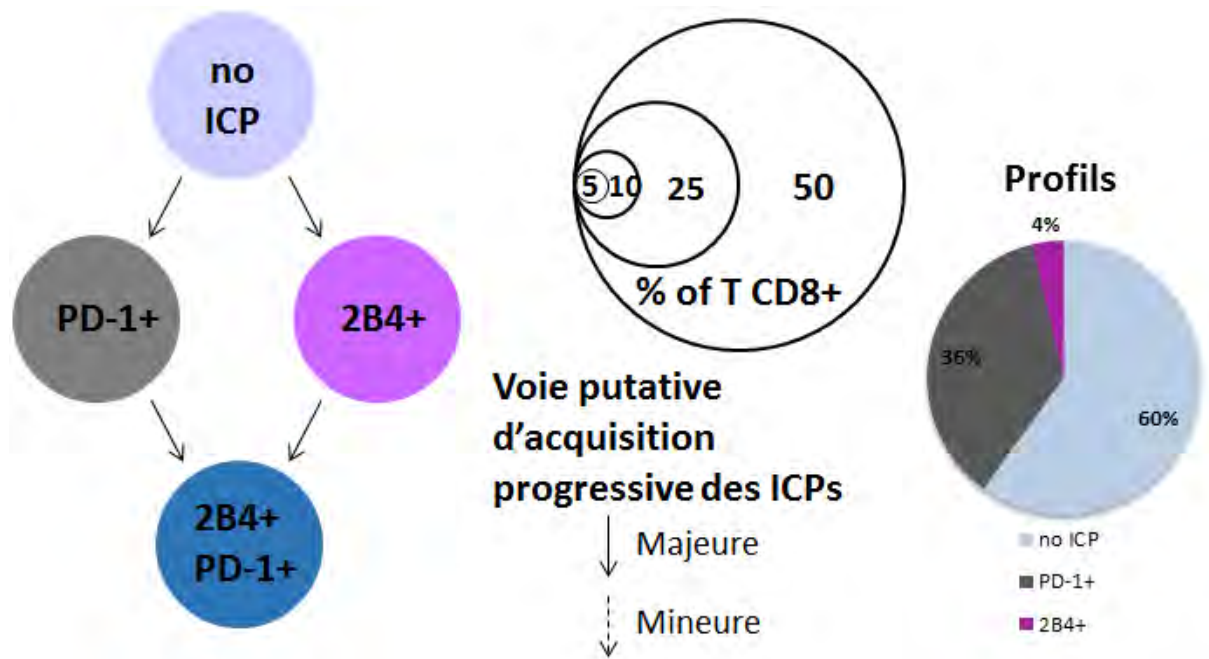


Figure 39 : Profils d'acquisition des immunos-checkpoints sur les LT CD4+

Dans notre cohorte, 3 principaux profils d'acquisition d'ICPs par les LT CD4+ ont été observés. L'acquisition initiale d'ICPs se fait soit par l'expression de PD-1, soit de 2B4. Les LT CD4+/PD-1+ peuvent ensuite exprimer 2B4. Les LT CD4+/2B4+ acquièrent de leur côté PD-1. Le CD160 est très rarement exprimé.

Les 3 principaux profils observés sont définis selon :

- La présence majoritaire (>70%) de lymphocytes T CD4+ n'exprimant aucun ICP : profil no ICP qui concerne 48 patients
- L'expression de PD-1 comme 1^{er} ICP : profil PD-1+ observé chez 29 patients
- L'expression de 2B4 comme 1^{er} ICP : profil 2B4+ que l'on retrouve chez 3 patients

4) c) Profil no ICP

48 patients sur 80.

Survie à 28 jours : 79 %

Survie à 90 jours : 70 %

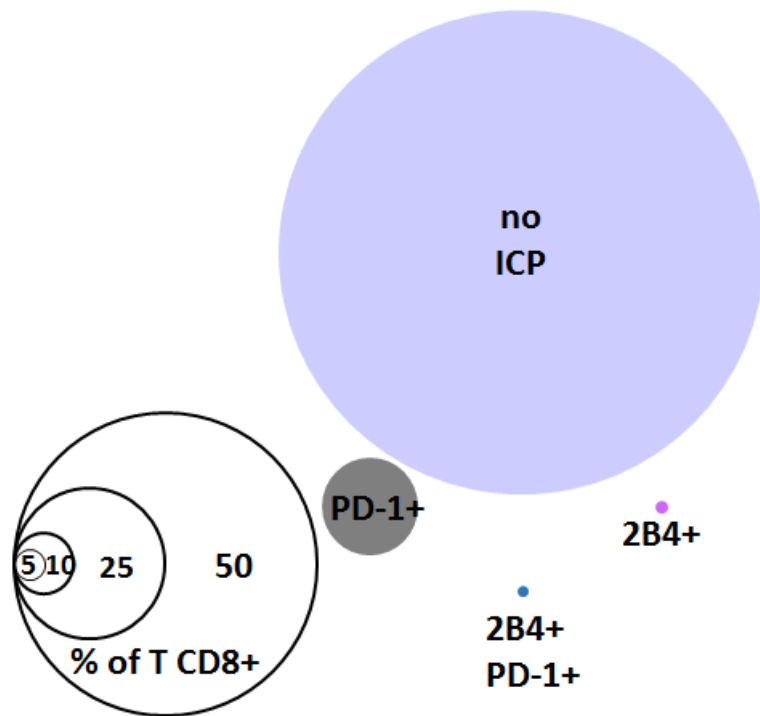


Figure 40 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD4+ n'exprimant aucun des ICPs étudiés : profil no ICP

48 patients présentent une majorité (> 70%) de LT CD4+ n'exprimant aucun des ICPs étudiés (profil no ICP).

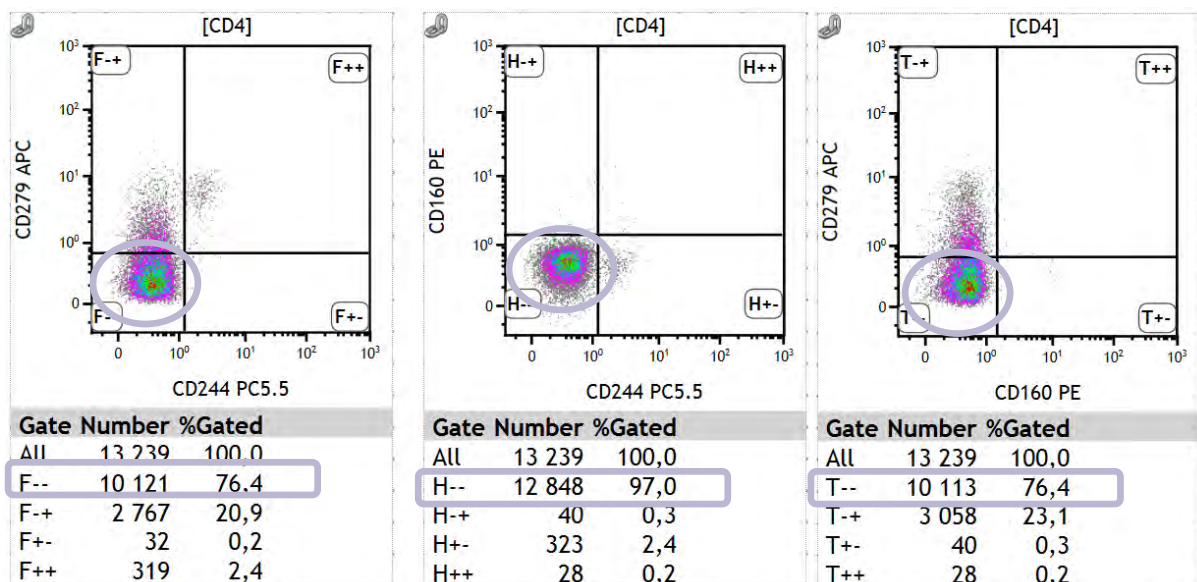


Figure 41 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD4+ majoritairement sans ICP
CD279 = PD-1 / CD244 = 2B4

4) d) Profil PD-1+

29 patients sur 80.

Survie à 28 jours : 76 %

Survie à 90 jours : 76 %

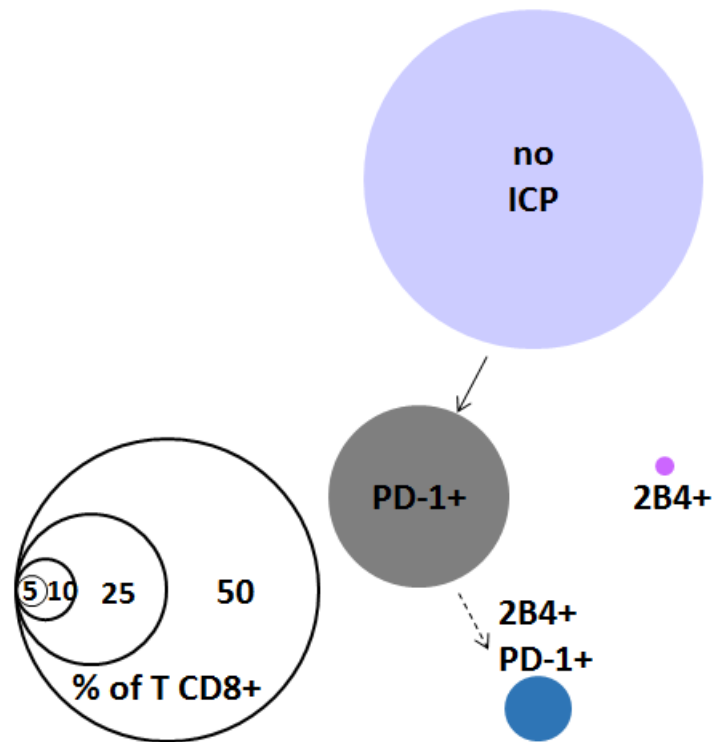


Figure 42 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD4+ exprimant prioritairement PD-1 : profil PD-1+

Parmi les patients ayant moins de 70% de LT CD4+ sans ICPs, 29 patients présentent une majorité de LT CD4+ exprimant prioritairement PD-1. Pour ces patients, la voie d'expression des ICPs passe par l'expression de PD-1. L'expression de 2B4 semble dépendante de cette expression initiale de PD-1. L'expression du CD160 sur les LT CD4+ est rare (Figure 43).

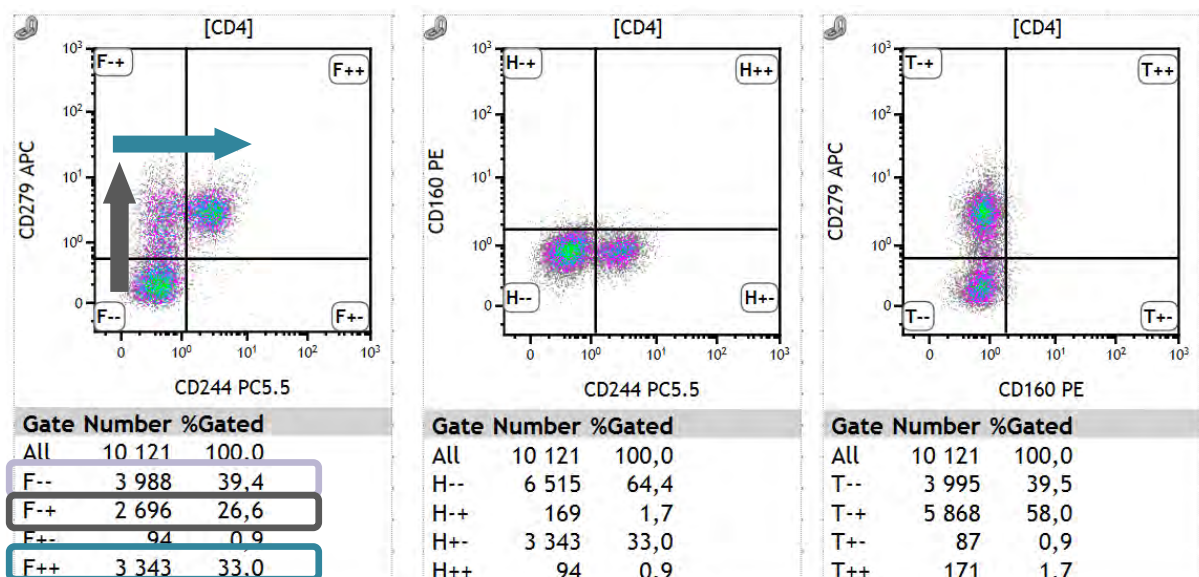


Figure 43 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD4+ prioritairement PD-1+ (Gris : acquisition de PD-1 / bleu-vert : acquisition de 2B4 via PD-1) CD279 = PD-1 / CD244 = 2B4

4) e) Profil 2B4+

3 patients sur 80.

Survie à 28 jours : 100 %

Survie à 90 jours : 100 %

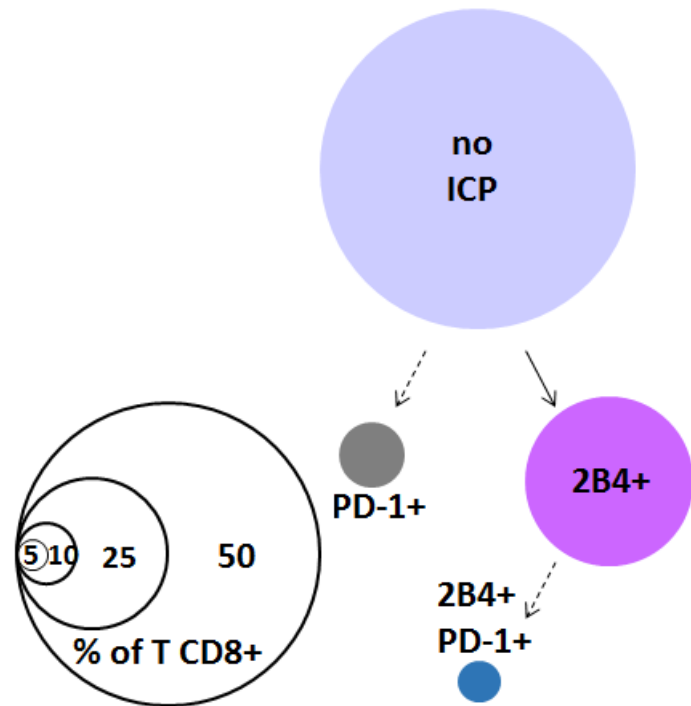


Figure 44 : Profil des patients présentant une majorité de LT CD4+ exprimant prioritairement 2B4 : profil 2B4+

Parmi les patients ayant moins de 70% de LT CD4+ sans ICPs, 3 patients présentent une majorité de LT CD4+ exprimant 2B4 en premier. Pour ces rares patients, la voie d'expression des ICPs passe prioritairement par l'expression de 2B4. L'expression de PD-1 semble indépendante de cette expression initiale de 2B4. Il n'a pas été observé d'expression du CD160 sur les LT CD4+ de ces patients (Figure 45).

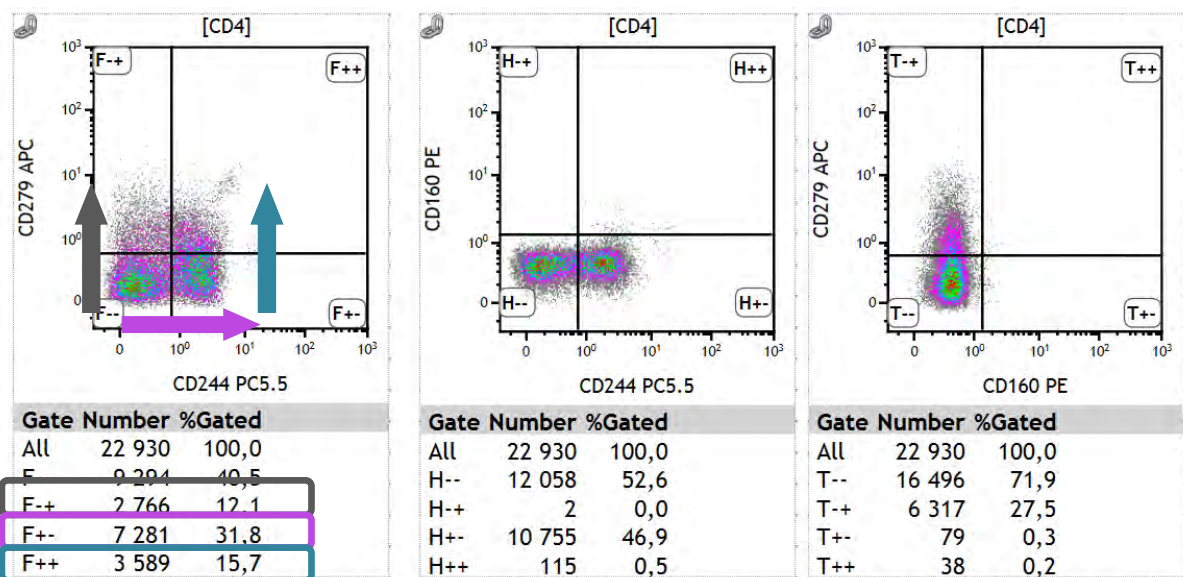


Figure 45 : Exemple d'histogramme de patient avec un profil de LT CD4+ prioritairement 2B4+

(rose : acquisition de 2B4 / bleu-vert : acquisition de PD-1 via 2B4 / gris : acquisition de PD-1 seul)

CD279 = PD-1 / CD244 = 2B4

4) f) Comparaison des profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+ vis-à-vis de l'âge, du nombre de lymphocytes, de LT, de Tregs et du rapport CD4+/CD8+

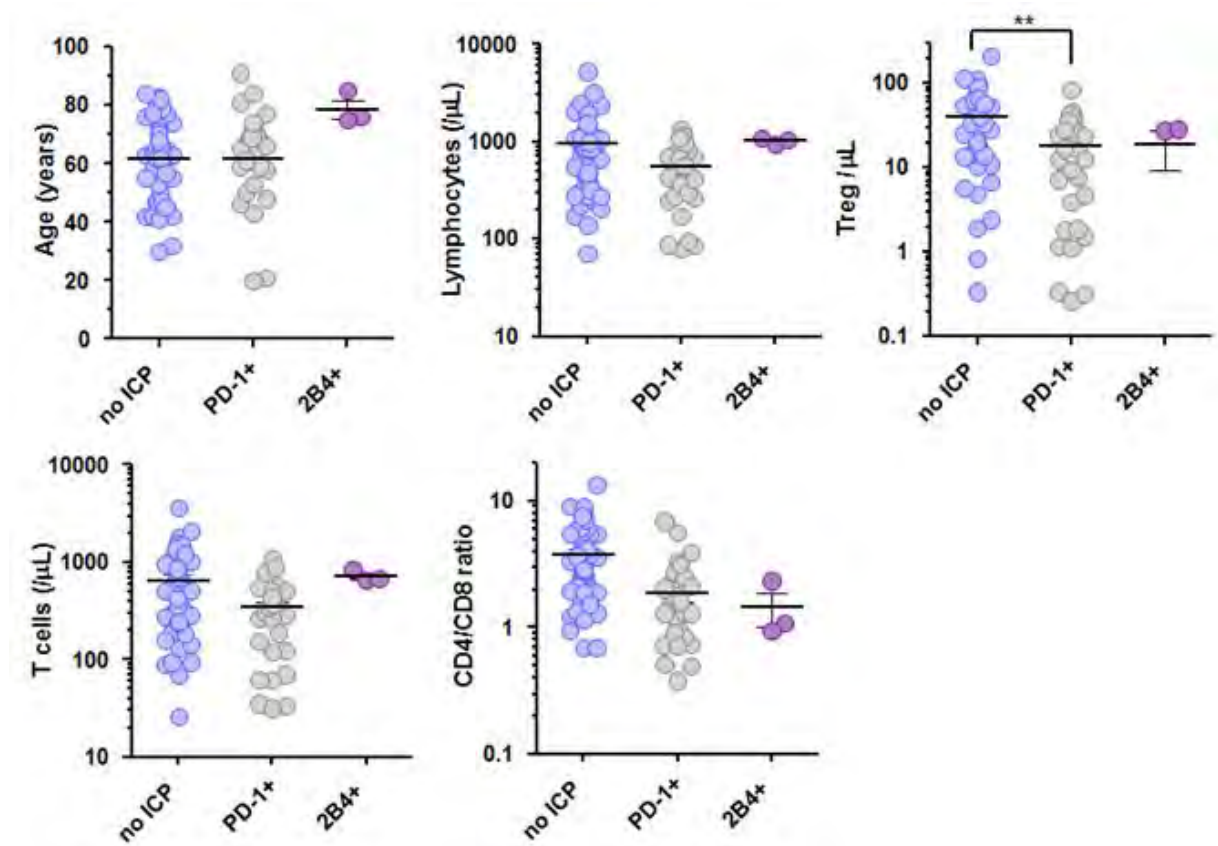


Figure 46 : Comparaison des profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+ vis-à-vis de l'âge, du nombre de lymphocytes, de LT, de Tregs et du rapport CD4+/CD8+

Concernant l'âge, le nombre de lymphocytes, de LT et le rapport CD4+/CD8+, nous ne retrouvons pas de différence significative entre les différents profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+ (Figure 46).

Concernant le nombre absolu de Tregs, nous observons une différence significative ($p=0.0025$) entre le profil no ICP et le profil PD-1+ mais pas de différence significative entre les autres profils.

Le nombre de Tregs circulants en valeur absolue est significativement plus élevé pour les patients au profil no ICP que pour les patients au profil PD-1+.

5) Trois profils immunitaires majeurs distinguent les patients en choc septique

Patients		Profil T CD8+			
		no ICP	PD-1+	2B4+/PD-1+	2B4+/CD160+
Profil T CD4+	no ICP	14	0	29	5
	PD1+	3	2	20	4
	2B4+	0	0	0	3

Tableau 8 : Comparaison des profils majoritaires d'acquisition d'ICPs selon le nombre de patients

Survie à J90 (%)		Profil T CD8+			
		no ICP	PD-1+	2B4+/PD-1+	2B4+/CD160+
Profil T CD4+	no ICP	85	-	63	60
	PD-1+	100	0	75	100
	2B4+	-	-	-	100

Tableau 9 : Comparaison des profils majoritaires d'acquisition d'ICPs selon la survie

A noter que ces observations ne représentent que des tendances. Les groupes observés sont trop restreints pour permettre des associations significatives.

- La plupart des patients n'exprimant aucun des ICPs étudiés sur les LT CD8+ (n = 17), ne semblent pas non plus exprimer d'ICP sur les LT CD4+. La survie semble plutôt bonne d'autant plus lorsque les LT CD4+ expriment majoritairement PD-1.
- Les rares patients (n = 2) exprimant PD-1 en premier sur les LT CD8+, expriment aussi PD-1 sur les LT CD4+ et leur survie semble médiocre (2 décès).
- La plupart des patients (n = 49) présentent une majorité de LT CD8+ exprimant 2B4 puis PD-1. Ces patients sont répartis de façon homogène entre les profils no ICP et PD-1+ des LT CD4+. Ce groupe de patients semble montrer une survie plutôt mauvaise.

- Les 3 profils d'expression d'ICPs des LT CD4+ sont retrouvés seulement parmi les patients qui présentent une majorité de LT CD8+ exprimant 2B4 puis CD160 (n = 12). La survie semble diminuée uniquement pour les patients exprimant aucun ICP sur les LT CD4+.
- Parmi les profils des LT CD8+, nous montrons à nouveau que les patients qui expriment PD-1 tendent vers un plus mauvais pronostic. Il apparaît aussi que l'absence d'expression d'ICP par les LT CD4+ assombrit le pronostic dans chaque profil CD8+.

Trois profils sont surreprésentés:

- Ceux qui associent la présence majoritaire (>50%) de LT CD8+ n'exprimant aucun ICP et de LT CD4+ (>70%) n'exprimant aucun ICP : profil no ICP/no ICP qui concerne 14 patients
- Ceux qui associent la présence majoritaire de LT CD8+ exprimant 2B4 puis PD-1 et la présence majoritaire de LT CD4+ (>70%) n'exprimant aucun ICP : profil 2B4/no ICP observé chez 29 patients
- Ceux qui associent la présence majoritaire de LT CD8+ exprimant 2B4 puis PD-1 et la présence majoritaire de LT CD4+ exprimant prioritairement PD-1 : profil 2B4/PD-1 que l'on retrouve chez 20 patients

Nous avons comparé ces 3 profils majoritaires entre eux (Figure 47).

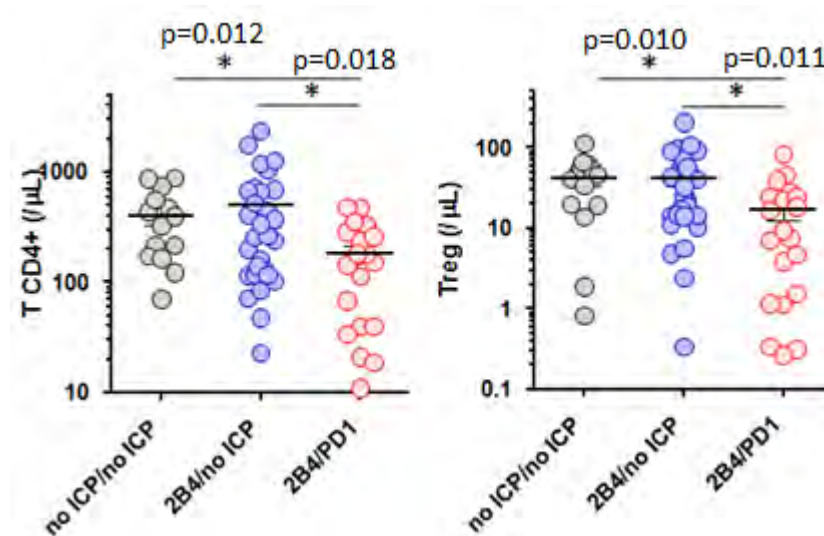


Figure 47 : Comparaison des 3 profils majoritaires d'acquisition d'ICPs sur les CD4+ et CD8+ vis-à-vis du nombre de CD4+ /µL et de Tregs /µL

Nous observons une diminution significative du nombre de LT CD4+ et de Tregs pour le profil 2B4/PD-1 (majorité de LT CD8+ exprimant 2B4 puis PD-1 et une majorité de LT CD4+ exprimant prioritairement PD-1) par rapport aux deux autres groupes.

Les patients ayant une majorité de LT CD4+ exprimant prioritairement PD-1 ont significativement moins de LT CD4+ et de Tregs, quel que soit le profil des LT CD8+.

6) Les profils immunitaires des patients en choc septique corrént avec différents pronostics

6) a) L'expression de PD-1 par les LT CD8+ est de mauvais pronostic

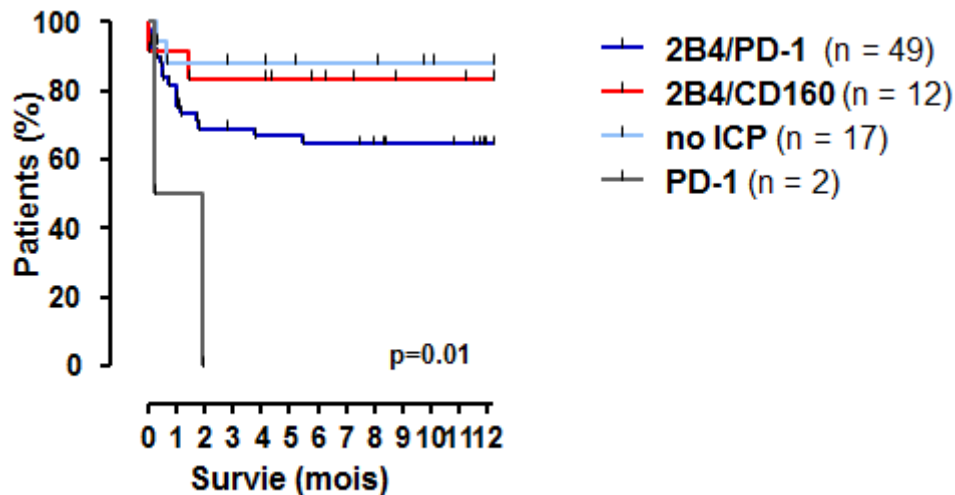


Figure 48 : Courbes de survie en fonctions des principaux profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+

L'étude des courbes de survie nous permet d'observer diminution significative ($p = 0.01$) de la survie pour les patients présentant une majorité de LT CD8+ exprimant PD-1 (profil 2B4/PD-1 et profil PD-1) par comparaison aux 2 autres profils.

Pour ces profils la survie est inférieure à 70% après un an de suivi.

La survie est sensiblement identique pour les profils no ICP (LT CD8+ n'exprimant majoritairement aucun ICP) et 2B4/CD160 (LT CD8+ exprimant prioritairement 2B4 puis CD160).

Quel que soit le profil, l'essentiel des décès surviennent dans les deux premiers mois suivant le choc septique.

6) b) L'expression de PD-1 par les LT CD4+ n'a pas d'impact sur le pronostic

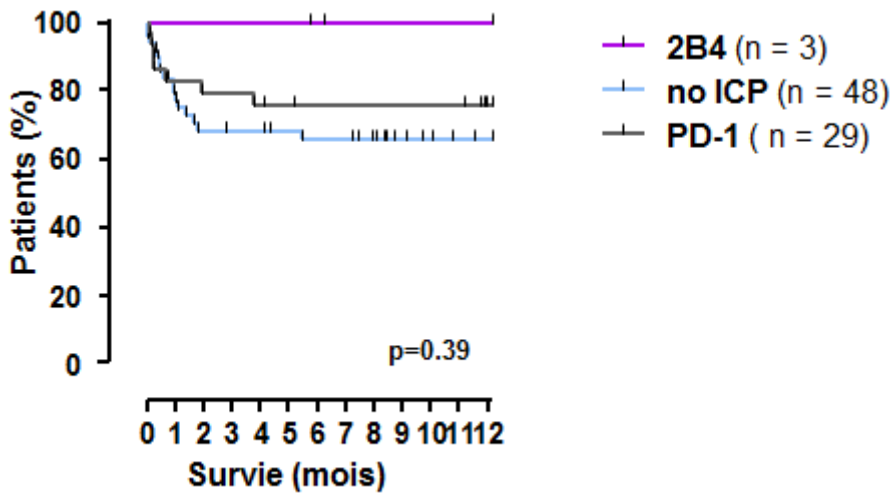


Figure 49 : Courbes de survie en fonctions des principaux profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+

L'étude des courbes de survie ne nous permet pas d'observer de différences significatives entre les profils majoritaires d'acquisition d'ICP sur les LT CD4+.

Nous pouvons cependant observer que les patients exprimant prioritairement PD-1 sur les LT CD4+ ont tendance ($p = 0.39$) à présenter une meilleure survie (survie supérieure à 70% à 1 an) que les patients dont les LT CD4+ n'expriment majoritairement aucun ICP (survie inférieure à 70% à 1 an).

Les patients exprimant prioritairement 2B4 sur les LT CD4+, ont tendance à présenter une meilleure survie (100% de survie à 1 an) que les deux autres profils.

Pour ces profils, l'essentiel des décès sont survenus dans les deux premiers mois suivant le choc.

6) c) Le profil immunitaire 2B4/PD1 sur les LT CD8+ et no ICP sur les LT CD4+ est le plus défavorable chez les patients en choc septique

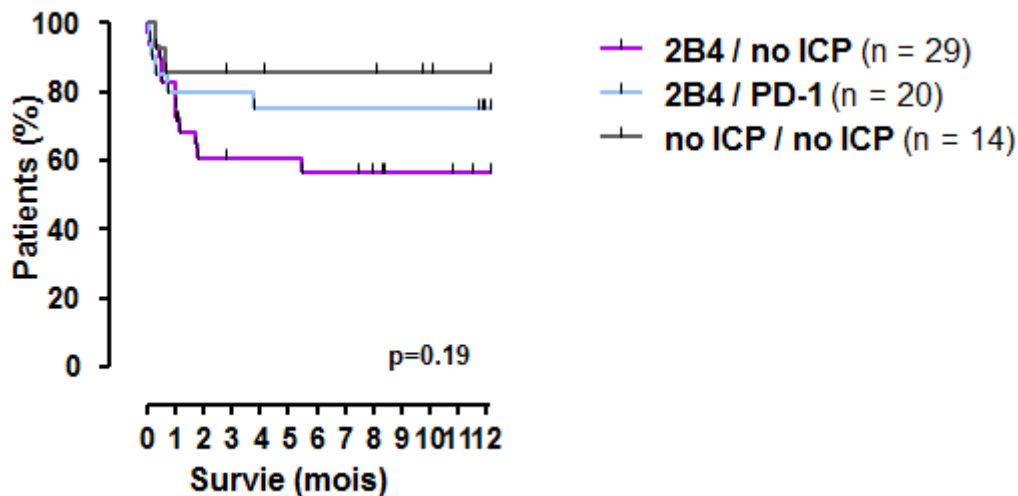


Figure 50 : Courbes de survie en fonction des 3 principaux profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+ et CD4+

L'étude des courbes de survie ne nous permet pas d'observer de différence significative de survie entre les 3 profils majoritaires d'acquisition d'ICP sur les LT CD4+ et CD8+.

Nous pouvons cependant observer que les patients qui n'expriment majoritairement aucun ICP ni sur les LT CD4+ ni sur les LT CD8+ ont tendance ($p = 0.19$) à présenter une meilleure survie (survie supérieure à 80% à 1 an). Il semble aussi que le profil des LT CD4+ impacte le taux de survie des patients de profil LT CD8+ 2B4/ PD-1 (survie proche de 80% à 1 an lorsque les T CD4+ expriment PD1 contre une survie inférieure à 60% à 1 an lorsque les LT CD4+ n'expriment aucun ICP).

Pour ces 3 profils, l'essentiel des décès sont survenus dans les deux premiers mois suivant le choc septique.

Partie 4 : Discussion

La plupart des études récentes (18) se rejoignent sur l'existence d'un état d'immunosuppression au cours du sepsis et du choc septique.

L'épuisement lymphocytaire, décrit dans de nombreuses situations infectieuses, notamment virales, ou tumorales, semble jouer un rôle central dans cet état d'immunosuppression lié au sepsis. Dans ces situations, l'état d'épuisement semble marqué par l'expression progressive à la surface des LT, de multiples immune checkpoints (ICPs) à vocation co-inhibitrice (ou récepteurs co-inhibiteurs) tels que PD-1, 2B4 ou CD160, observés dans l'étude (18)(57).

L'état d'immunosuppression induit par le sepsis semble aussi être marqué par l'apoptose massive de cellules immunitaires, y compris de lymphocytes et certaines études ont pu mettre en évidence une diminution significative du nombre de lymphocytes circulants (18).

Par ailleurs, une augmentation relative du nombre de Tregs a été rapportée comme prenant part à cet état d'immunosuppression (18).

En étudiant l'évolution quantitative et phénotypique des LT au cours des premiers jours de choc septique de 80 patients admis en réanimation, nous avons voulu étayer et compléter ces observations, en vue d'établir des profils immunitaires pronostiques.

Notre étude présente des différences significatives avec les principaux travaux explorant les profils immunitaires de patients en sepsis.

Premièrement, toutes les études existantes comparent une cohorte de patients en sepsis ou choc septique avec un effectif de sujets sains. L'étude de Guignant et al. (108), en plus des sujets sains, compare aussi les profils immunitaires de patients hospitalisés pour choc septique avec des patients hospitalisés pour trauma. Dans notre travail, nous n'avons pas utilisé de cohorte témoin. D'abord parce que nous avons considéré que l'étude des profils immunitaires de sujets sains ne présente qu'un intérêt limité. Il est en effet plus que probable que les LT de patients en sepsis présentent des profils différents des LT de sujets sans contact avec un pathogène. Un tel groupe contrôle ne permet pas vraiment de montrer qu'il existe une réaction immunitaire inappropriée, inefficace ou un épuisement lymphocytaire spécifique (87). L'objectif de notre étude était avant tout d'étudier la diversité des profils immunitaires de sujets en état de choc septique afin d'expliquer les évolutions cliniques différentes entre ces patients.

Une autre différence importante est notre approche de l'expression des ICPs. La plupart des études existantes sur le sujet étudient simplement l'expression isolée d'un seul ICP à la surface des LT afin d'évaluer son impact pronostique (Tableau 10). Dans notre travail, nous montrons que l'acquisition d'ICPs paraît se faire de façon progressive (84) et par divers chemins, ce qui nécessite l'analyse simultanée de plusieurs ICPs sur les LT CD8+ mais aussi sur les LT CD4+.

Evolution du nombre de lymphocytes totaux/ μL , de LT CD4+ et CD8+/ μL et de Tregs/ μL

Pour ces 4 paramètres, nous rapportons plusieurs résultats intéressants (Figure 22).

Premièrement, nous observons une lymphopénie inférieure à 1500 lymphocytes/ μL chez 90% des patients, inférieure à 1000 lymphocytes/ μL chez 70% des patients et inférieure à 500 lymphocytes chez 41% des patients dès l'admission en réanimation.

Nous rapportons également une augmentation significative du nombre de lymphocytes circulants entre J1 et J7. Cette augmentation est significativement plus importante chez les patients survivants que chez les patients décédés à J90 (Figure 22). Alors que les LT CD4+ augmentent significativement entre J1 et J7 et de manière plus importante chez les patients survivants, les LT CD8+ ne montrent pas d'augmentation significative. Les LT CD8+ semblent pourtant varier dans leur composition et les patients décédés montrent un taux de LT effecteurs plus important que les patients survivants à J90 (Figure 26).

Nos observations vont dans le même sens que plusieurs études.

La grande majorité des études rapportent une lymphopénie profonde dès l'admission en réanimation (61)(75)(76)(81)(116). Cette lymphopénie semble concerner toutes les sous populations lymphocytaires et ne pas subir d'évolution au cours des premières 48 heures (76). Le Tulzo et al. (61) montrent dans leur étude que la lymphopénie profonde est associée à des marqueurs phénotypiques d'apoptose et que sa persistance à J6 est associée à un pronostic péjoratif. L'étude de Drewry et al. (75) sur une cohorte consécutive (335 patients en sepsis) associent eux aussi la persistance de la lymphopénie à J4 à un pronostic péjoratif à J28 et à un an. Dans cette étude, un nombre de lymphocytes inférieur à 600/ μL à J4 est associé à la survenue d'infections nosocomiales. Boomer et al. (116) rapportent aussi une tendance à l'augmentation entre J1 et J7 chez 24 patients en choc septique sans association au pronostic tandis que Tomino et al. (81) ne rapportent pas d'évolution de la lymphopénie entre J1 et J7.

Dans notre étude, la grande majorité des patients présentent une lymphopénie dès l'admission. Les patients survivants à J90 présentent augmentation significative du nombre de lymphocytes circulants, notamment CD4+, par comparaison aux patients décédés et ces résultats sont donc assez concordants avec les observations existantes.

Expression d'ICPs sur les LT CD8+

Nous avons tout d'abord, comme la plupart des études, étudié simplement l'expression isolée des ICPs (2B4, PD-1 et CD160) à J1, J3 et J7 (Figure 27). Nous ne retrouvons aucune différence significative concernant le pourcentage de LT CD8+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 entre les patients

survivants et les patients décédés à J90. L'ICP le plus fréquemment exprimé à la surface des LT CD8+ est 2B4 suivi par PD-1 puis CD160. Nous n'observons pas d'évolution au cours des 7 premiers jours du choc septique.

Cette étude de l'expression isolée d'ICPs à la surface des LT CD8+ nous paraît insuffisante et nous avons donc déterminé les profils d'acquisition progressive d'ICPs par les LT CD8+ (Figure 28).

Différentes voies d'acquisition d'ICPs sont observées :

- La plupart des patients (n=49) présentent une majorité de LT CD8+ exprimant prioritairement 2B4 puis PD-1
- 12 patients présentent une majorité de LT CD8+ exprimant prioritairement 2B4 puis CD160
- Seulement 2 patients présentent une majorité de LT CD8+ exprimant PD-1 en premier
- 17 patients présentent une majorité de LT CD8+ n'exprimant aucun ICP

Sachant que les ICPs même à vocation co-inhibitrice peuvent être exprimés de manière transitoire lors de l'activation lymphocytaire au cours d'une infection (Figure 15) (87)(88), il semble prématuré d'associer systématiquement l'expression de ces ICPs à l'épuisement lymphocytaire.

La moyenne d'âge de notre cohorte est de 63 ans et à cet âge-là les LT mémoires peuvent représenter jusqu'à 50% des LT circulants (54). On sait aussi que même à l'état latent (en absence d'activation), les LT CD8+ mémoires peuvent exprimer faiblement des ICPs tels que 2B4 (87) qui présente à la fois des propriétés co-stimulatrices et co-inhibitrices (110). PD-1 et CD160 au contraire, sont rarement exprimés sur les LT mémoires latents et leur expression dépend le plus souvent d'une activation lymphocytaire (87)(88). Ces observations peuvent expliquer pourquoi 2B4 est l'ICP le plus exprimé sur les LT CD8+ dans notre étude. Dans ces conditions il est difficile d'affirmer quelle part de l'expression de 2B4 est dépendante de l'activation lymphocytaire liée au sepsis et quelle part représente l'expression physiologique sur les LT mémoires latents circulants. Au cours de leurs travaux sur le sepsis, ni Spec et al. (117) ni Chen et al. (118) ne retrouvent d'expression accrue de 2B4 sur les LT CD8+ comparé aux sujets sains (tableau 10). Nous avons peu de détails dans le travail de Spec et al. mais Chen et al. (12 patients en choc septique d'une moyenne d'âge de 52 ans / 13 sujets sains d'une moyenne d'âge non connue) rapportent une forte proportion de LT CD8+/2B4+ à la fois chez le sujet sain (45%) et chez le patient septique (47%). Ces résultats sont en faveur d'une absence d'évolution de l'expression de 2B4 sur les LT CD8+ au cours du choc septique.

Lors de notre étude des profils d'acquisition progressive d'ICPs, nous remarquons que l'expression de PD-1 et de CD160 est dépendante d'une expression initiale de 2B4 sur les LT CD8+. Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'activation lymphocytaire T CD8+ lors du sepsis semble se faire principalement à partir de LT mémoires latents 2B4+. Ces LT CD8+ mémoires 2B4+

acquerraient alors progressivement PD-1 et CD160 lors de leur activation, voire de leur épuisement en cas d'interaction prolongée avec le pathogène.

On peut observer que les rares patients (n=2) dont les LT CD8+ expriment PD-1 sans passer par l'expression de 2B4 (pour qui l'activation ne se fait donc pas à partir de LT mémoires latents 2B4+) sont tous les deux décédés à J90. L'activation lymphocytaire dans ces 2 cas, se fait donc soit à partir de LT naïfs soit à partir de LT mémoires 2B4-. Ce profil est évidemment trop peu fréquent pour prouver toute association significative.

Une étude de l'expression de 2B4 sur les LT CD8+ de sujets sains ou chez les patients de notre cohorte, à distance du choc septique aurait pu permettre de confirmer l'expression pérenne de 2B4 sur les LT mémoires latents circulants et l'absence d'augmentation de son expression chez les patients septiques.

L'expression de 2B4 par les LT CD8+ n'a pas été étudiée dans les travaux de Guignant et al. (108), de Zhang et al. (109), de Tomino et al. (81) ou de Boomer et al. (116) qui sont focalisés sur l'étude de l'expression de PD-1, de ses ligands et d'autres ICPs. Parmi ces études, seuls Zhang et al. observent une augmentation de l'expression de PD-1 en MFI (Mean Fluorescence Intensity) ainsi que du pourcentage de LT CD8+PD-1+ par rapport aux sujets sains. Spec et al. rapportent seulement une augmentation du niveau d'expression de PD-1 sur les LT CD8+ (Tableau 10).

Les résultats sont donc discordants entre ces études et l'augmentation de l'expression de PD-1 sur les LT CD8+ au cours du sepsis ne semble pas faire consensus dans la littérature.

Avec en moyenne environ 35% de LT CD8+ exprimant PD-1 dans notre cohorte (Figure 27), et sachant que les LT circulants de sujets sains (LT naïfs et mémoires latents) expriment généralement peu de PD-1 (87), nos résultats se rapprocheraient plutôt des travaux de Zhang et al. et de Spec et al.

A notre connaissance, aucune étude ne retrouve d'association significative entre l'expression d'un ICP sur les LT CD8+ et la mortalité ou la survenue d'infections nosocomiales (Tableau 10).

L'étude des courbes de survie en fonction des différents profils d'acquisition d'ICPs (Figure 48) nous permet de démontrer que la survie est significativement diminuée ($p=0.01$) dans les groupes exprimant PD-1 à la surface des LT CD8+ (Figure 48). Qu'elle se fasse à partir de LT CD8+2B4+ (probables LT mémoires) ou à partir de LT CD8+2B4- (probables LT naïfs ou mémoires 2B4-), l'expression de PD-1 sur les LT CD8+ est donc associée dans notre cohorte à une mauvaise réponse clinique.

A notre connaissance c'est la première fois qu'une telle observation est faite dans le cadre d'une cohorte de patients en choc septique.

A notre connaissance, aucun travail de recherche orienté sur le sepsis n'a étudié l'expression du CD160 sur les LT CD8+.

Nous avons vu que l'expression simultanée de 2B4, PD-1 et CD160 sur les LT CD8+ est associée à un état d'épuisement lymphocytaire avancé dans des modèles de viroses chronique ou de cancer (88)(113)(114).

L'expression simultanée, par les LT CD8+, des trois ICPs étudiés est peu fréquente dans notre cohorte et le pourcentage de LT CD8+ exprimant les 3 ICPs n'est pas significativement différent entre les patient décédés et survivants au cours des 7 premiers jours du sepsis. Ces observations peuvent nous laisser penser que très peu de patients étaient dans un état d'épuisement lymphocytaire avancé au moment du diagnostic ou que l'épuisement lymphocytaire doit être évalué à partir d'autres ICPs. Néanmoins, nous pouvons supposer que les patients, ayant été prélevés dans les premiers jours d'hospitalisation en réanimation, n'avaient probablement pas été assez longtemps en contact avec le pathogène pour développer un état d'épuisement lymphocytaire avancé, qui devrait être réévalué à distance du choc.

Lorsque l'on compare les profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD8+ à différentes variables comme l'âge, le nombre de lymphocytes, de LT ou de Tregs (Figure 37), nous ne retrouvons pas de différences significatives entre les profils.

Le rapport CD4+/CD8+ est significativement plus élevé chez les patients présentant un profil sans expression d'ICPs que pour le profil CD8+/2B4+/CD160+. Cette information, difficilement interprétable en l'état, pourrait correspondre à une augmentation des LT CD4+ ou une diminution des LT CD8+ ou une addition des deux phénomènes.

Expression d'ICPs sur les LT CD4+

Comme pour les LT CD8+, nous avons tout d'abord étudié simplement l'expression isolée des ICPs (2B4, PD-1 et CD160) à J1, J3 et J7. Nous ne retrouvons aucune différence significative concernant le pourcentage de LT CD4+ exprimant PD-1, 2B4 ou CD160 entre les patients survivants et les patients décédés à J90. Dans notre cohorte, l'ICP le plus fréquemment exprimé à la surface des LT CD4+ est PD-1 suivi par 2B4. Le CD160 est très rarement exprimé. Nous n'observons pas d'évolution au cours des 7 premiers jours du choc septique (Figure 38).

Comme pour les LT CD8+, l'étude de l'expression isolée d'ICPs à la surface des LT CD8+ nous paraît peu pertinente et nous avons donc observé les profils d'acquisition progressive d'ICPs par les LT CD4+ (Figure 39).

Différentes voies d'acquisition d'ICPs sont observées :

- La plupart des patients (n=48) présentent une majorité de LT CD4+ n'exprimant aucun ICP
- 29 patients expriment PD-1 en premier
- Seulement 3 patients expriment 2B4 en premier

La plupart des études rapportent elles aussi l'expression de PD-1 par les LT CD4+ (Tableau 10). Guignant et al. (108) ainsi que Zhang et al. (109) observent une augmentation significative de l'expression de PD-1 en MFI et en pourcentage de LT CD4+/PD-1+ chez les patients septiques par comparaison aux sujets sains. Boomer et al. (116) observent simplement une tendance des LT CD4+ à exprimer plus fortement (MFI) PD-1+ chez les patients septiques que chez les sujets sains.

Tomino et al. (81) rapportent un pourcentage de LT CD4+/PD-1+ augmenté à J1 et J3 du sepsis en comparaison aux sujets sains avec un retour à la normale à J7. Seuls les patients décédés conservent une expression augmentée. Contrairement à ces résultats, nous ne retrouvons pas de variation de profils d'expression d'ICPs sur les LT CD4+ au cours des 7 premiers jours du choc septique et aucune différence significative entre les patients survivants et décédés. Au contraire, dans notre étude, les patients dont les LT CD4+ expriment majoritairement PD-1+ ont un meilleur pronostic que les patients n'exprimant aucun ICP. Nos résultats sont donc différents de ceux de Tomino et al. qui associent l'expression d'ICP sur les LT à un mauvais pronostic au cours du sepsis (81).

Les travaux de Spec et al. (117) et Chen et al. (118) s'intéressant à l'expression de 2B4+ sur les LT CD4+ montrent des résultats discordants. Chen et al. rapportent une augmentation du pourcentage de LT CD4+/2B4+ chez les patients septiques par comparaison aux contrôles alors que Spec et al. ne retrouvent pas d'augmentation significative. Dans notre étude, seuls 3 patients sur 80 expriment prioritairement 2B4 sur les LT CD4+ et 2B4 est en moyenne exprimé par 9% des LT CD4+ au moment du diagnostic. Même si nos résultats ne sont pas directement et comparables en l'absence de sujets contrôles, les résultats se rejoignent sur le fait que moins de 10% des LT CD4+ expriment 2B4 lors du choc septique. Le modèle murin utilisé par Chen et al. met également en évidence une expression précoce de 2B4 sur les LT CD4+ et CD8+ suivie d'une diminution rapide de son expression à J4 du sepsis induit par ligature et ponction du caecum. La diminution non significative du pourcentage de LT CD4+/2B4+ entre J1 et J7 (9% à J1 et 5% à J7 en moyenne) observée dans notre étude est compatible avec ces observations. L'étude du modèle murin utilisé par Chen et al. semble aussi mettre en évidence une action plutôt délétère de 2B4 sur les fonctions lymphocytaires et sur le pronostic au cours du sepsis induit. Toutefois, aucune de ces études ne retrouve de lien entre l'expression de 2B4 par les LT CD4+ et le pronostic en pathologie humaine.

Le CD160 est rarement exprimé par les LT CD4+ dans notre étude (1% des LT CD4+ en moyenne à J1) et à notre connaissance, aucun autre travail de recherche orienté sur le sepsis n'a étudié l'expression du CD160 sur les LT CD4+.

Parmi tous ces travaux, seule l'étude menée par Tomino et al. (81) a permis d'associer l'expression d'un ICP au pronostic. C'est la persistance de l'expression de PD-1 sur les LT-CD4+ qui est associée dans cette étude à un pronostic défavorable. Nous avons vu que notre étude mettait en doute ces résultats au vu du poids de notre cohorte plus grande (80 patients en choc septique vs 18 patients en choc septique). Au contraire, dans notre cohorte, les patients présentant une majorité de LT CD4+ exprimant PD-1 présentent une meilleure survie que les patients aux LT CD4+ n'exprimant aucun ICP (Tableau 9). Cette tendance suggère la nécessité d'une activation lymphocytaire CD4+, marquée par l'expression même transitoire d'ICPs sur les LT effecteurs, pour une réponse anti-infectieuse efficace.

En comparant les différents profils d'acquisition d'ICPs sur les LT CD4+ à différentes variables comme l'âge, le nombre de lymphocytes, de LT ou le rapport CD4+/CD8+, nous ne retrouvons pas de différences significatives entre les profils. Nous observons cependant une augmentation significative du nombre de Tregs chez les patients au profil no ICP par rapport aux patients avec un profil PD-1+ (Figure 47).

Ces résultats mettent en évidence un groupe de patients présentant un taux augmenté de Tregs, qui s'oppose à un autre groupe de patients qui exprime des ICPs sur les LT CD4+. Ces données méritent d'être mises en rapport avec la fonctionnalité des Tregs dans les 2 groupes de patients ou avec leur capacité à produire des cytokines immunosuppressives comme le TGF- β et l'IL-10.

Autant pour les LT CD4+ que les LT CD8+, il nous paraît prématuré d'associer systématiquement l'expression d'ICPs en phase aiguë du choc septique à un état d'épuisement lymphocytaire, d'autant plus lorsque leur expression est faible ou peu diversifiée. Nous avons vu précédemment qu'un état d'épuisement lymphocytaire était marqué par l'expression multiple et persistante de multiples récepteurs co-inhibiteurs (88)(113)(114).

Une étude des fonctions lymphocytaires (prolifération, sécrétion de cytokines) pourrait également être intéressante pour compléter notre étude. Elle pourrait nous permettre d'associer d'éventuelles dysfonctions lymphocytaires aux profils d'acquisition d'ICPs observés. Les échantillons ayant été conservés congelés, un complément d'étude allant dans ce sens est toujours possible.

Comparaison des profils d'acquisition progressive d'ICPs par les LT CD4+ et les LT CD8+

(Tableau 8 et 9)

La majorité des patients n'exprimant aucun des ICPs étudiés sur les LT CD8+ (n = 17), ne semble pas non plus exprimer d'ICP sur les LT CD4+. Dans ce groupe, la survie apparaît plutôt bonne malgré une absence d'activation lymphocytaire. La survie est encore meilleure lorsque les LT CD4+ expriment PD-1. Sous réserve de la faible représentativité statistique de ces résultats, ces observations peuvent nous faire penser que dans ce groupe, l'évolution clinique des patients en sepsis ne dépend pas de l'activation lymphocytaire T, notamment CD8+. On sait que l'immunité anti-bactérienne est plutôt médiée par cellules phagocytaires et, même si elle nécessite une part d'immunité humorale et une activité CD4+ auxiliaire, l'activité CD8+ cytotoxique entre peu en jeu. Ceci fait penser que les paramètres myéloïdes (PNN, monocytes) peuvent être de bons marqueurs pronostiques dans ce groupe de patients.

Les rares patients exprimant principalement PD-1 sur les LT CD8+, expriment aussi PD-1 sur les LT CD4+ et leur survie semble médiocre (2 décès/2 patients).

Les patients (n = 49) qui présentent une majorité de LT CD8+ exprimant 2B4 puis PD-1 sont répartis de façon uniforme au niveau du profil d'expression de PD-1 par les LT CD4+. Ce groupe de patients semble montrer une survie diminuée.

De manière générale, les patients dont l'activation lymphocytaire CD8+ passe par l'expression de PD-1, soit à partir de LT CD8+ 2B4- (2 patients) soit à partir de LT CD8+ 2B4+ (49 patients) constituent un groupe de moins bon pronostic.

Les patients qui présentent une majorité de LT CD8+ exprimant 2B4 puis CD160 (n = 12) sont répartis de façon homogène au niveau du profil d'expression d'ICPs par les LT CD4+. La survie semble bonne seulement pour les patients exprimant PD-1 ou 2B4 sur les LT CD4+. Les rares patients (n = 3) exprimant 2B4 sur les LT CD4+ présentent tous une majorité de LT CD8+ exprimant 2B4 puis CD160 et leur réponse clinique semble bonne.

De manière générale, les patients qui présentent une majorité de LT CD4+ exprimant des ICPs (PD-1 ou 2B4) présentent une meilleure survie que les patients n'exprimant aucun des ICPs étudiés. Cette observation fait penser qu'une activation lymphocytaire CD4+, marquée par l'expression même transitoire d'ICPs, est nécessaire pour une réponse anti-infectieuse efficace.

Lorsque l'on compare les profils d'acquisition d'ICP sur les LT CD4+ et CD8+, on constate que 3 profils sont quantitativement majoritaires (Tableau 9) :

- 14 patients présentent une majorité de LT CD4+ et CD8+ n'exprimant aucun ICP

- 29 patients présentent une majorité de LT CD8+ exprimant 2B4 puis PD-1 et une majorité de LT CD4+ n'exprimant aucun ICP
- 20 patients présentent une majorité de LT CD8+ exprimant 2B4 puis PD-1 et une majorité de LT CD4+ exprimant prioritairement PD-1

L'étude de la courbe de survie sur ces 3 populations (Figure 50) met en évidence les mêmes tendances ($p=0.19$) que celles observées dans ce paragraphe sans toutefois apporter de confirmation statistique.

De manière intéressante, on observe pour le troisième profil, une diminution significative du nombre de LT CD4+ et de Tregs par rapport aux deux autres profils (Figure 47). La principale différence de ce profil est l'expression de PD-1 par les LT CD4+.

Cette observation peut faire penser que PD-1 corrèle avec un défaut de prolifération ou un excès de mortalité des LT CD4+. Cette constatation semble illustrer le rôle de l'expression PD-1 au cours de l'activation lymphocytaire qui consiste à restreindre la réponse lymphocytaire en vue de limiter les dommages tissulaires (119). Néanmoins, l'expression de PD-1 par les LT CD4+ a tendance à être associé à un bon pronostic, soulignant l'ambivalence de l'immunosuppression dans le sepsis. Encore une fois, une étude des fonctions prolifératives des LT CD4+/ PD1+ ou PD-1- pourrait nous permettre de clarifier ces observations.

Variation d'expression des ICPs au cours des premiers jours du sepsis

Notre cohorte nous a permis d'observer les profils immunitaires de 80 patients à J1, de 57 patients à J3 et de 36 patients à J7. Chez ces patients, nous n'avons pas observé de variations significatives des profils d'expression d'ICP sur les LT CD4+ ou CD8+. Trois autres études ont aussi étudié l'évolution d'expression au cours des 7 à 10 premiers jours du sepsis (Tableau 10).

Dans l'étude de Guignant et al. (108), l'expression de PD-1 sur les LT a pu être étudiée chez 10 patients sur les 64 initiaux et il n'a pas été montré de variations d'expression de PD-1 sur les LT entre J1 et J10.

Boomer et al. (116) ne montrent pas d'évolution de l'expression de PD-1 sur les LT CD4+ et CD8+ au cours des 7 premiers jours du sepsis mais une augmentation significative dans l'expression de CTLA-4 de TIM-3 et de LAG-3 et une diminution d'expression du CD127 par les LT.

Au contraire, Tomino et al. (81) montrent une variation dans l'expression du PD-1 à la surface des LT CD4+ avec une augmentation de l'expression de PD-1 chez les patients septiques à J1 et J3 puis un retour à la normale à J7, excepté pour les trois patients décédés. L'expression de PD-1 sur les LT CD8+ n'a pas été étudiée.

En ce qui concerne l'évolution de l'expression des ICPs, nos résultats confirment ceux de Guignant et al. et de ceux de Boomer et al. qui ne montrent pas de modifications significatives. Notre cohorte étant bien plus importante que celle présentée dans le travail de Tomino et al. (80 patients en choc septique vs 18 patients en choc septique) nous pouvons nous permettre de discuter leurs résultats.

Tregs

Nous n'avons pas observé d'évolution significative du nombre de Tregs en valeur absolue au cours des premiers jours de choc septique dans notre cohorte. Nous n'avons pas non plus observé d'association significative entre le nombre de Tregs et la survie. Toutefois, nous avons observé une tendance à l'augmentation progressive du pourcentage de Tregs/LT CD4+ entre J1 et J7, notamment chez les patients décédés à J90.

Nous rapportons trois études ayant observé le nombre de Tregs ou l'évolution du nombre de Tregs au cours du choc septique.

Premièrement, Venet et al. (103), montrent une augmentation du pourcentage de Tregs circulants (augmentation relative) chez 30 patients en choc septique par comparaison à des sujets sains.

Guignant et al. (108) rapportent également une augmentation significative du pourcentage de Tregs dans leur cohorte de 64 patients en choc septique par comparaison à des sujets sains.

Enfin, Boomer et al. (116) ne montrent pas d'augmentation significative du pourcentage de Tregs par rapport aux sujets sains à J0 mais une augmentation significative entre J0 et J7.

Il est intéressant de noter que pour ces trois études, une diminution des lymphocytes, notamment T CD4+ est observée en parallèle de l'augmentation des Tregs. L'augmentation relative (en pourcentage) du nombre de Tregs est donc soit à mettre sur le compte d'une diminution du nombre de LT CD4+ soit d'une augmentation réelle du nombre de Tregs, soit des deux. Dans notre étude, on observait plutôt une augmentation du nombre de LT CD4+ en parallèle d'une augmentation du pourcentage de Tregs.

Dans tous les cas, tandis qu'au cours du choc septique, il semble exister une diminution des LT notamment CD4+, probablement par des mécanismes d'apoptose (61), les Tregs ne semblent pas diminuer mais au contraire augmenter de façon relative. On peut donc penser que les Tregs résistent mieux à l'apoptose induite lors du sepsis que les LT CD4+ non Tregs (103).

Etude	Cohorte	Paramètres	Echantillon / Mortalité	Constats
Guignant et al. 2011 (108)	64 patients en choc septique vs 13 trauma vs 49 sujets sains contrôles	Expression PD-1, PD-L1, PD-L2 sur CD4+ et CD8+ et monocytes / Tregs Etude de la prolifération lymphocytaire et dosage d'IL-10	Prélevés : J1-3 / J3-5 / J6-10 Mortalité à J28	<ul style="list-style-type: none"> - % de monocytes PD-1+ ou PD-L1+ ou PD-L2+ augmentés et MFI augmentée sepsis vs trauma vs contrôles - % de CD4+ PD-1+ ou PD-L1+ (mais pas PD-L2) augmentés et MFI augmentée sepsis vs trauma vs contrôles - Pas d'expression accrue de PD-1 sur les LT CD8+ - 10 patients ont été prélevés jusqu'à à J6-10 : pas de variation d'expression de PD-1 sur les lymphocytes et monocytes - J1-3 : expression (MFI) de PD-L1 augmentée sur les monocytes chez les patients décédés - J3-5 : expression (MFI augmentée de PD-1 et PD-L2 sur monocytes chez patients avec infection nosocomiale. - Pas d'association entre l'expression de PD-1 sur les CD4+ et la mortalité ou la survenue d'infections nosocomiales - CD4+ diminués et % Tregs augmentés sepsis vs contrôle
Zhang et al. 2011 (109)	19 patients en choc septique vs 22 sujets sains contrôles	Expression PD-1, PD-L1 sur CD4+ CD8+, LB et monocytes. Etude de l'apoptose	Prélevés : premier jour de l'inclusion Pas d'étude du pronostic	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de l'expression (MFI) de PD-1 sur les CD4+ et CD8+ et du % de CD4+/PD-1+ et CD8+/PD1+ vs contrôle - Augmentation expression (MFI) PD-L1 sur monocytes et du % de monocytes PD-L1+ vs contrôle - Augmentation des marqueurs phénotypiques d'apoptose chez les patients en choc septique vs contrôle
Boomer et al. 2012 (116)	24 patients en sepsis sévère 12 sujets sains contrôles	Expression de PD-1, CTLA-4, LAG-3, BTLA, TIM-3, CD69, CD127, CD25 Tregs	Prélevés : J0 et J7 Pas d'étude du pronostic	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de différence significative d'expression de PD-1 sur les CD4+ et CD8+ sepsis vs contrôles. Seulement une tendance des CD4+ à exprimer (MFI) plus fortement PD-1 vs contrôle. - Pas de différence significative du % de Tregs vs contrôle à J1 mais augmentation significative à J7 - Diminution du % de CD4+ et tendance à la diminution des CD8+ - Diminution de % de NK et de DCs - Modification du profil d'expression d'ICPs entre J1 et J7
Spec et al. 2016 (117)	17 patients en sepsis à candida vs 16 sujets sains contrôles	Expression PD-1, PD-L1, CD28, CD127, 2B4, TIM-3, BTLA, CD57 sur CD4+ et CD8+	Prélevés : < 1-2j après positivité des hémocultures Mortalité à J90	<ul style="list-style-type: none"> - Expression (MFI) accrue de PD-1 sur les CD8+ mais pas de différence sur le % de CD8+PD-1+ vs contrôle - Pas de différence d'expression (MFI) de PD-1 sur CD4+ sepsis vs contrôle - Expression (MFI) accrue de PD-L1 et % de CD8+PD-L1 augmenté sur CD8+ sepsis vs contrôle - Expression accrue (MFI) de PD-L1 mais pas de différence de % de CD4+/PD-L1+ sur CD4+ sepsis vs contrôle - Pas de différences d'expression de 2B4, BTLA, TIM-3 ou CD57 sur les CD4+ ou CD8+ - Diminution non significative du CD127 sur les CD4+ sepsis vs contrôle

Chen et al. 2017 (118)	12 patients en sepsis 13 sujets sains contrôles	Expression de 2B4 sur les CD4+ et CD8+. Expression de PD-1, BTLA, CD28 et ICOS sur les CD4+ 2B4+/-	Prélevés : < 24 h après le diagnostic de sepsis	- Augmentation du pourcentage de CD4+/2B4+ chez patients septiques vs contrôles (1.96% -> 6.04%) - Pas de différences d'expression de 2B4 sur les CD8+ (44.6% -> 47.1%) et NK
Tomino et al. 2017 (81)	18 patients en choc septique ayant un CMV latent 10 sujets sains contrôles	Expression de PD-1 sur les CD4+, du HLA-DR sur monocytes. PCR CMV Diversité du TCR	Prélevés : J1 (diagnostic), J3, J7. Mortalité J28	- Augmentation d'expression de PD-1 sur CD4+ vs contrôles et normalisation à J7 sauf pour les patients décédés. - Diminution expression HLA-DR sur monocytes vs contrôles de J1 à J7 - 3 réactivations CMV pour les 3 patients décédés - diminution de diversité du répertoire TCR à J1 et J3 avec récupération à J7 - lymphopénie patients en choc septique vs contrôles jusqu'à J7
Venet et al. 2009 (103)	30 patients en choc septique 17 sujets sains contrôles	Tregs HLA-DR sur monocytes	Prélevés entre J3 et J7 Pas d'étude du pronostic	- Augmentation significative du % de Tregs circulants vs contrôles. Augmentation corrélée à une diminution de la réponse proliférative au mitogènes des patients septiques - Diminution du nombre de CD4+ / μ L vs contrôles - Diminution d'expression du HLA-DR sur les monocytes vs contrôles
Notre étude 2017	80 patients en choc septique Pas de sujets sains inclus	Expression de PD-1, 2B4 et CD160 sur CD4+ et CD8+ / Tregs et expression de PD-1 sur les Tregs	Prélevés : J1 / J3 / J7 Mortalité J28 et J90	- Diminution significative de la survie pour les patients dont les LT CD8+ expriment PD-1 - Tendance à une meilleure survie dans le groupe de patient dont les LT CD4+ expriment PD-1 - Pas dévolution d'expression d'ICPs au cours des 7 premiers jours de sepsis - Augmentation significative du nombre de lymphocytes et de LT CD4+ entre J1 et J7 pour les patients survivants à J90

Tableau 10 : Tableau comparatif de différents travaux observant les profils immunitaires au cours du sepsis
MFI (Mean Fluorescence Intensity)

Limites de l'étude

Malgré la cohorte de 80 patients que nous avons testés, le faible effectif de certains profils immunitaires rend l'analyse statistique non significative pour ces groupes particuliers. Au vu des profils observés (5-10%), il nous faudrait doubler le nombre de patients pour avoir un effectif suffisant. Autrement, il nous faudrait sélectionner seulement certains groupes pour l'analyse statistique.

Une hypothèse évoquée dans notre travail est que l'échantillonnage est peut-être trop précoce pour permettre l'observation d'un état d'épuisement lymphocytaire avancé. Nous suggérons que l'exposition au pathogène est probablement trop brève dans la phase aiguë du choc septique pour induire des dysfonctions lymphocytaires ou l'acquisition d'ICPs. Des études suggèrent qu'un état

d'épuisement lymphocytaire profond pouvait être atteint en 2 à 4 semaines d'exposition à un antigène (84)(85). Il pourrait être intéressant, dans une prochaine étude, d'évaluer le profil immunitaire des patients 3 semaines ou 1 mois après le début du choc septique.

Il a été montré que les ICPs, qu'ils soient à vocation co-stimulatrice ou co-inhibitrice, peuvent être exprimés de façon transitoire ou à faible taux, à la surface des LT effecteurs sans pour autant entrer dans un mécanisme d'épuisement lymphocytaire (87). Pour associer l'expression d'ICPs, ou les profils d'acquisition d'ICPs, à un état d'épuisement lymphocytaire, il serait intéressant d'étudier les fonctions lymphocytaires telles que les capacités prolifératives ou de sécrétion de cytokines, comme il a été fait dans d'autres études. Les échantillons ayant été conservé congelés, il est toujours possible d'approfondir les recherches dans ce sens.

Une donnée intéressante apportée par l'étude de Tomino et al. (81) est la réactivation systématique et spécifique du CMV pour les patients décédés qui présentaient une immunité ancienne. Nous n'avons pas analysé la présence d'une infection ancienne ou d'une réactivation de CMV pour le moment. Il serait intéressant de voir si les sérologies pour le CMV et autres virus latents, peuvent être obtenues pour ces patients.

On sait que l'immunité anti-bactérienne est plutôt l'apanage des cellules phagocytaires et, même si elle nécessite une part d'immunité humorale et une activité CD4+ auxiliaire, l'activité CD8+ cytotoxique entre peu en jeu. Une l'étude parallèle du profil immunitaire des cellules phagocytaires ou des cellules du système immunitaire inné comme les monocytes/macrophages, les PNN et cellules dendritiques pourrait être intéressante.

Au moment de la rédaction du manuscrit, il nous manquait encore certaines données cliniques comme la survenue d'infections nosocomiales, le type et l'espèce des pathogènes en causes. Ces données seront à compléter pour la suite de l'étude et pourront peut-être permettre de mettre en évidence de nouveaux résultats.

Conclusion

Cette étude du profil immunitaire des patients de réanimation en choc septique, notamment l'étude de l'acquisition d'immunes checkpoints sur les LT, nous permet plusieurs observations intéressantes.

Premièrement, dans notre cohorte, la grande majorité des patients présentent une lymphopénie dès l'admission et l'augmentation du nombre de lymphocytes circulants, notamment CD4+, est associée à un pronostic favorable.

D'autre part, l'activation lymphocytaire T CD8+ semble débiter par l'expression de 2B4 ; peut-être à partir des LT mémoires 2B4+. Qu'elle se fasse dans de rares cas à partir de LT CD8+ 2B4- (LT naïfs ou mémoires 2B4-) ou à partir de LT mémoires 2B4+, l'activation lymphocytaire marquée par l'expression de PD-1 est statistiquement associée à un groupe de patients pour lesquels la survie est moins bonne ; ce qui n'est pas observé avec l'expression de CD160.

Au contraire, pour les LT CD4+, 2B4 est rarement exprimé et l'activation semble être marquée par l'expression de PD-1. L'expression d'ICPs par les LT CD4+ corrèle avec un groupe de patients pour lesquels la survie est meilleure.

Au total l'expression de PD-1 sur les LT CD8+ est statistiquement associée à un mauvais pronostic alors que l'expression de PD-1 ou 2B4 sur les LT CD4+ a tendance à être de bon pronostic.

Notre étude est la première, à notre connaissance, à mettre en évidence une association significative entre l'expression de PD-1 par les LT CD8+ et le pronostic dans le choc septique.

L'observation des différents profils d'acquisition d'ICP nous permet d'observer des tendances intéressantes même si, la plupart du temps, les effectifs des groupes sont trop restreints pour observer des associations significatives. Une étude sur une cohorte plus large ou de façon prospective en association avec les services de réanimation pourrait être intéressante.

Que ça soit concernant les LT CD8+ ou les LT CD4+, l'expression simultanée des 3 immunes checkpoints étudiés est rarement majoritaire dans notre cohorte, ce qui peut nous laisser penser que peu de patients présentent un état d'épuisement lymphocytaire avancé. La précocité de l'échantillonnage peut expliquer en partie l'absence de signes apparents d'immunosuppression du fait d'une exposition trop brève à l'antigène. Un échantillonnage plus tardif à 3 semaines ou un mois de la phase aiguë du choc associé à une étude des fonctions lymphocytaires pourrait peut-être permettre des observations plus franches. Les échantillons ayant été conservés congelés, une étude des fonctions lymphocytaires est possible et devrait permettre de compléter ces observations.

Un nombre important de patients n'expriment aucun des 3 ICPs étudiés, que ce soit sur les LT CD4+ ou les LT CD8+, et ne semblent donc présenter aucun signe d'activation lymphocytaire dans les premiers jours du sepsis, et ce, sans retentissement apparent sur la survie. Cette observation pouvait concorder avec le fait que la clairance bactérienne lors du sepsis est peu dépendante de l'activation

lymphocytaire notamment CD8+. On peut penser qu'une étude parallèle des cellules phagocytaires et du système immunitaire inné comme les monocytes/macrophages, les PNN et cellules dendritiques pourrait être intéressante pour compléter ce travail.

Il manquait un certain nombre de données cliniques au moment de la rédaction du manuscrit et leur connaissance permettra probablement de nouvelles observations.

Enfin, la survie dans le choc septique dépend de nombreuses variables et notamment des différences de prise en charge, de co-morbidités et de type de pathogène en cause.

Il est important d'interpréter avec précaution la significativité d'un marqueur phénotypique isolé au sein d'une réponse immunitaire complexe.

Bibliographie :

1. Vincent J-L, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med.* mai 2014;2(5):380-6.
2. Adhikari NKJ, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet Lond Engl.* 16 oct 2010;376(9749):1339-46.
3. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 févr 2016;193(3):259-72.
4. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B, EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* avr 2004;30(4):580-8.
5. Quenot J-P, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou J-C, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care Lond Engl.* 25 avr 2013;17(2):R65.
6. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med.* mai 2013;41(5):1167-74.
7. Kaukonen K-M, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA.* 2 avr 2014;311(13):1308-16.
8. Schlapbach LJ, Straney L, Alexander J, MacLaren G, Festa M, Schibler A, et al. Mortality related to invasive infections, sepsis, and septic shock in critically ill children in Australia and New Zealand, 2002-13: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* janv 2015;15(1):46-54.
9. Kissoon N, Carcillo JA, Espinosa V, Argent A, Devictor D, Madden M, et al. World Federation of Pediatric Intensive Care and Critical Care Societies: Global Sepsis Initiative. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc.* sept 2011;12(5):494-503.
10. Shankar-Hari M, Rubenfeld GD. Understanding Long-Term Outcomes Following Sepsis: Implications and Challenges. *Curr Infect Dis Rep.* nov 2016;18(11):37.
11. Guirgis FW, Brakenridge S, Sutchu S, Khadpe JD, Robinson T, Westenbarger R, et al. The long-term burden of severe sepsis and septic shock: Sepsis recidivism and organ dysfunction. *J Trauma Acute Care Surg.* sept 2016;81(3):525-32.
12. Ou S-M, Chu H, Chao P-W, Lee Y-J, Kuo S-C, Chen T-J, et al. Long-Term Mortality and Major Adverse Cardiovascular Events in Sepsis Survivors. A Nationwide Population-based Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2016;194(2):209-17.
13. Adrie C, Alberti C, Chaix-Couturier C, Azoulay E, De Lassence A, Cohen Y, et al. Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J Crit Care.* mars 2005;20(1):46-58.

14. 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*. 23 févr 2016;315(8):801-10.
15. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. juill 1996;22(7):707-10.
16. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*. janv 2008;8(1):32-43.
17. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. oct 2007;35(10):2408-16.
18. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. déc 2013;13(12):862-74.
19. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care Lond Engl*. 28 juill 2011;15(4):R183.
20. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 19 déc 2011;208(13):2581-90.
21. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 29 août 2013;369(9):840-51.
22. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 19 mars 2010;140(6):805-20.
23. Owen J, Punt J, Stranford S. *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. Dunod; 2014. 832 p.
24. Tada T, Takemori T, Okumura K, Nonaka M, Tokuhiya T. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J Exp Med*. 1 févr 1978;147(2):446-58.
25. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 31 oct 1996;383(6603):787-93.
26. Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr Opin Immunol*. avr 2009;21(2):153-60.
27. Torchinsky MB, Blander JM. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger. *Cell Mol Life Sci CMLS*. mai 2010;67(9):1407-21.
28. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. avr 2007;8(4):345-50.
29. Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res*. janv 2010;20(1):4-12.

30. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev.* nov 2005;4(8):579-86.
31. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* avr 2003;4(4):330-6.
32. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* mai 2009;30(5):626-35.
33. Huter EN, Punkosdy GA, Glass DD, Cheng LI, Ward JM, Shevach EM. TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur J Immunol.* juill 2008;38(7):1814-21.
34. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* avr 2007;19(4):345-54.
35. Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, et al. CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation.* déc 2012;35(6):1773-80.
36. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 17 juill 2000;192(2):303-10.
37. Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mars 2006;176(5):2808-16.
38. Park HJ, Park JS, Jeong YH, Son J, Ban YH, Lee B-H, et al. PD-1 Upregulated on Regulatory T Cells during Chronic Virus Infection Enhances the Suppression of CD8+ T Cell Immune Response via the Interaction with PD-L1 Expressed on CD8+ T Cells. *J Immunol.* 1 mai 2015;1401936.
39. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* févr 2002;16(2):311-23.
40. Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, Benoist C. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med.* 7 juin 2004;199(11):1479-89.
41. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* janv 2001;27(1):20-1.
42. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* juill 2008;8(7):523-32.
43. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol.* oct 2009;21(10):1105-11.
44. Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol.* 2012;40(2):186-204.

45. Zeng H, Zhang R, Jin B, Chen L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol*. sept 2015;12(5):566-71.
46. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*. mai 2015;15(5):295-307.
47. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 16 oct 2014;41(4):529-42.
48. Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol*. août 2004;4(8):595-602.
49. Demers KR, Reuter MA, Betts MR. CD8(+) T-cell effector function and transcriptional regulation during HIV pathogenesis. *Immunol Rev*. juill 2013;254(1):190-206.
50. Joshi NS, Kaech SM. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 févr 2008;180(3):1309-15.
51. Mahic M, Henjum K, Yaqub S, Bjørnbeth BA, Torgersen KM, Taskén K, et al. Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur J Immunol*. mars 2008;38(3):640-6.
52. Billerbeck E, Blum HE, Thimme R. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3- effector memory and de novo-generated FoxP3+ regulatory CD8+ T cells upon antigen recognition in vitro. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 juill 2007;179(2):1039-48.
53. Xu Z, Ho S, Chang C-C, Zhang Q-Y, Vasilescu E-R, Vlad G, et al. Molecular and Cellular Characterization of Human CD8 T Suppressor Cells. *Front Immunol [Internet]*. 2016 [cité 5 avr 2017];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5127796/>
54. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. janv 2014;14(1):24-35.
55. Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4+ T Cell Subsets. *BioMed Res Int [Internet]*. 2015 [cité 7 avr 2017];2015. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4637038/>
56. T cells: the usual subsets poster [Internet]. [cité 26 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=13007>
57. Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, Ayala A. The new normal: immuno-modulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med*. avr 2014;20(4):224-33.
58. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. mars 2013;13(3):260-8.
59. Cabrera-Perez J, Condotta SA, Badovinac VP, Griffith TS. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J Leukoc Biol*. nov 2014;96(5):767-77.
60. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE. Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(9):585-92.

61. 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* Augusta Ga. déc 2002;18(6):487-94.
62. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 27 nov 1997;390(6658):350-1.
63. Tamayo E, Gómez E, Bustamante J, Gómez-Herreras JI, Fonteriz R, Bobillo F, et al. Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *J Crit Care*. août 2012;27(4):415.e1-11.
64. 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*. déc 2015;98(6):1081-90.
65. Leliefeld PHC, Wessels CM, Leenen LPH, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care*. 2016;20:73.
66. Shen X-F, Cao K, Jiang J-P, Guan W-X, Du J-F. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med*. 28 févr 2017;
67. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. mars 2009;9(3):162-74.
68. Uhel F, Azaoui 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 Septic Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 févr 2017;
69. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. oct 2009;30(10):475-87.
70. Drewry AM, Ablordeppey EA, Murray ET, Beiter ER, Walton AH, Hall MW, et al. Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care Lond Engl*. 20 oct 2016;20(1):334.
71. Wu J-F, Ma J, Chen J, Ou-Yang B, Chen M-Y, Li L-F, et al. Changes of monocyte human leukocyte antigen-DR expression as a reliable predictor of mortality in severe sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 2011;15(5):R220.
72. Shao R, Fang Y, Yu H, Zhao L, Jiang Z, Li C-S. Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3–4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Crit Care [Internet]*. 2016 [cité 13 avr 2017];20. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4860759/>
73. 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*. sept 2011;37(9):1438-46.
74. Fan X, Liu Z, Jin H, Yan J, Liang H. Alterations of dendritic cells in sepsis: featured role in immunoparalysis. *BioMed Res Int*. 2015;2015:903720.

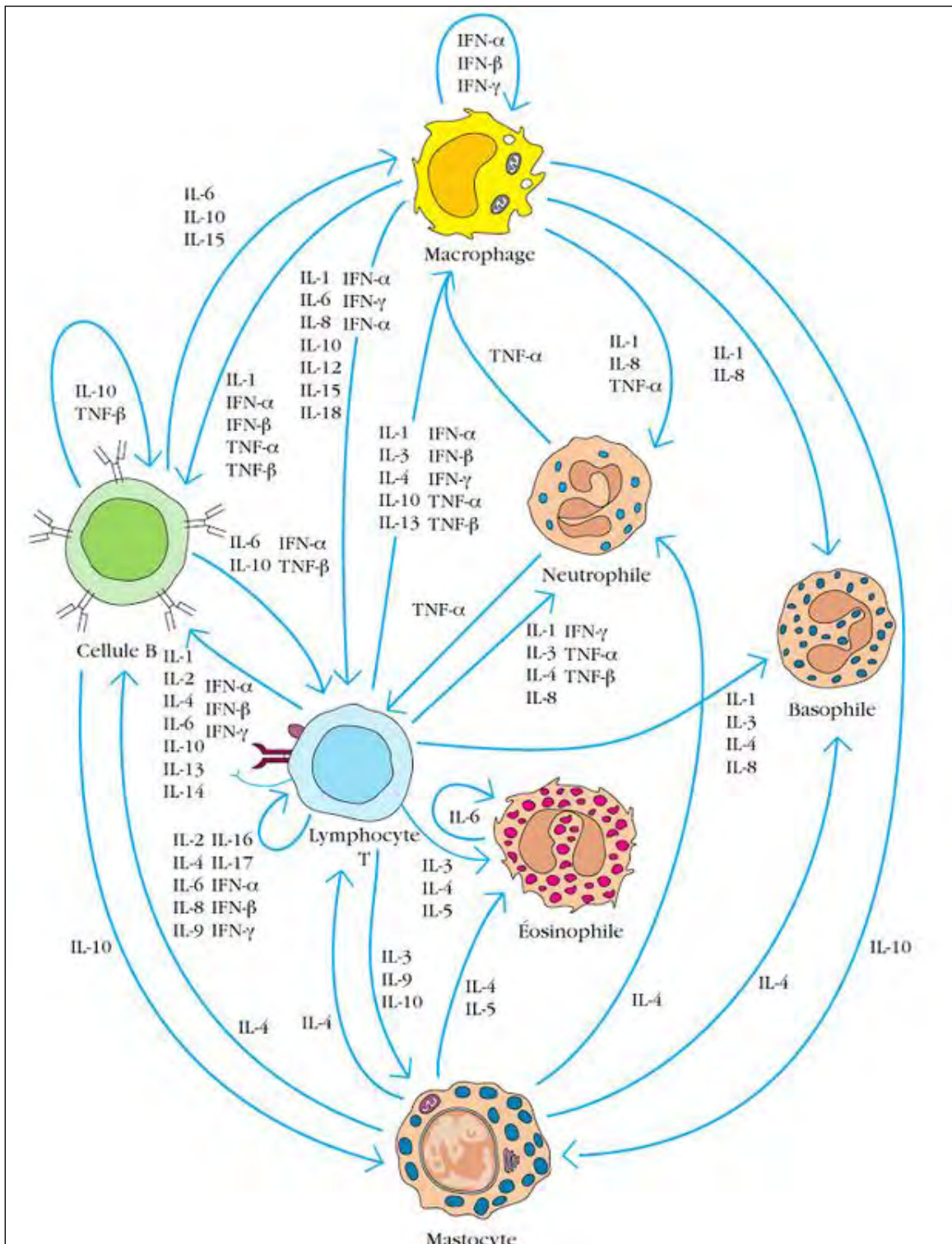
75. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent Lymphopenia after Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality. *Shock* Augusta Ga. nov 2014;42(5):383.
76. Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis M-A, Darbon R, et al. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* Augusta Ga. oct 2010;34(4):358-63.
77. 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*. 21 déc 2011;306(23):2594-605.
78. Pachot A, Monneret G, Voirin N, Leissner P, Venet F, Bohé J, et al. Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin Immunol* Orlando Fla. janv 2005;114(1):61-9.
79. Carson WF, Cavassani KA, Ito T, Schaller M, Ishii M, Dou Y, et al. Impaired CD4+ T-cell proliferation and effector function correlates with repressive histone methylation events in a mouse model of severe sepsis. *Eur J Immunol*. avr 2010;40(4):998-1010.
80. 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*. janv 2013;41(1):111-9.
81. Tomino A, Tsuda M, Aoki R, Kajita Y, Hashiba M, Terajima T, et al. Increased PD-1 Expression and Altered T Cell Repertoire Diversity Predict Mortality in Patients with Septic Shock: A Preliminary Study. *PloS One*. 2017;12(1):e0169653.
82. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 21 déc 1998;188(12):2205-13.
83. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Plückthun A, Elliott T, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med*. 4 mai 1998;187(9):1383-93.
84. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. août 2015;15(8):486.
85. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. juin 2011;12(6):492-9.
86. Crawford A, Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol*. avr 2009;21(2):179.
87. Viganò S, Perreau M, Pantaleo G, Harari A. Positive and negative regulation of cellular immune responses in physiologic conditions and diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:485781.
88. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol*. 2015;6:310.
89. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. janv 2009;10(1):29-37.

90. Ye B, Li X, Dong Y, Wang Y, Tian L, Lin S, et al. Increasing LAG-3 expression suppresses T-cell function in chronic hepatitis B: A balance between immunity strength and liver injury extent. *Medicine (Baltimore)*. janv 2017;96(1):e5275.
91. Raziourrouh B, Schraut W, Gerlach T, Nowack D, Grüner NH, Ulsenheimer A, et al. The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8+ T-cell function. *Hepatology*. déc 2010;52(6):1934-47.
92. Zhang Z, Zhang J-Y, Wherry EJ, Jin B, Xu B, Zou Z-S, et al. Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology*. juin 2008;134(7):1938-49. 1949.e1-3.
93. Ma C, Lu Z, Wang K, Bie L, Shen Q. [Elevated expression of lymphocyte activation gene-3 on peripheral blood CD8(+) T lymphocytes in patients with chronic hepatitis B virus infection]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol*. avr 2016;32(4):532-7.
94. Vali B, Jones RB, Sakhdari A, Sheth PM, Clayton K, Yue F-Y, et al. HCV-specific T cells in HCV/HIV co-infection show elevated frequencies of dual Tim-3/PD-1 expression that correlate with liver disease progression. *Eur J Immunol*. sept 2010;40(9):2493-505.
95. Sakhdari A, Mujib S, Vali B, Yue FY, MacParland S, Clayton K, et al. Tim-3 negatively regulates cytotoxicity in exhausted CD8+ T cells in HIV infection. *PloS One*. 2012;7(7):e40146.
96. Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res*. 15 févr 2012;72(4):887-96.
97. Viganò S, Banga R, Bellanger F, Pellaton C, Farina A, Comte D, et al. CD160-Associated CD8 T-Cell Functional Impairment Is Independent of PD-1 Expression. *PLOS Pathog*. 25 sept 2014;10(9):e1004380.
98. Chew GM, Fujita T, Webb GM, Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, et al. TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog* [Internet]. 7 janv 2016 [cité 21 avr 2017];12(1). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4704737/>
99. Chang KC, Burnham C-A, Compton SM, Rasche DP, Mazuski RJ, McDonough JS, et al. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 11 mai 2013;17(3):R85.
100. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 9 févr 2006;439(7077):682-7.
101. Odorizzi P, Wherry EJ. Inhibitory Receptors on Lymphocytes: Insights from Infections. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 avr 2012;188(7):2957-65.
102. Monneret G, Debard A-L, Venet F, Bohe J, Hequet O, Biennu J, et al. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med*. juill 2003;31(7):2068-71.
103. 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*. avr 2009;35(4):678.

104. Tatura R, Zeschnigk M, Adamzik M, Probst-Kepper M, Buer J, Kehrmann J. Quantification of regulatory T cells in septic patients by real-time PCR-based methylation assay and flow cytometry. *PLoS One*. 2012;7(11):e49962.
105. Huang L, Yao Y, Dong N, Yu Y, He L, Sheng Z. Association between regulatory T cell activity and sepsis and outcome of severely burned patients: a prospective, observational study. *Crit Care*. 2010;14(1):R3.
106. Penalzoza-MacMaster P, Kamphorst AO, Wieland A, Araki K, Iyer SS, West EE, et al. Interplay between regulatory T cells and PD-1 in modulating T cell exhaustion and viral control during chronic LCMV infection. *J Exp Med*. 25 août 2014;211(9):1905-18.
107. Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, Doering TA, Odorizzi PM, Barnett BE, et al. Molecular and transcriptional basis of CD4+ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity*. 20 févr 2014;40(2):289.
108. Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care Lond Engl*. 2011;15(2):R99.
109. Zhang Y, Li J, Lou J, Zhou Y, Bo L, Zhu J, et al. Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care*. 2011;15(1):R70.
110. Chlewicki LK, Velikovsky CA, Balakrishnan V, Mariuzza RA, Kumar V. Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244). *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 juin 2008;180(12):8159-67.
111. Speiser DE, Colonna M, Ayyoub M, Cella M, Pittet MJ, Batard P, et al. The Activatory Receptor 2B4 Is Expressed In Vivo by Human CD8⁺ Effector $\alpha\beta$ T Cells. *J Immunol*. 1 déc 2001;167(11):6165-70.
112. Peretz Y, He Z, Shi Y, Yassine-Diab B, Goulet J-P, Bordi R, et al. CD160 and PD-1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells defines a subset with advanced dysfunction. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002840.
113. Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, Timm J, Kuntz M, Blum HE, et al. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8⁺ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog*. 10 juin 2010;6(6):e1000947.
114. Yamamoto T, Price DA, Casazza JP, Ferrari G, Nason M, Chattopadhyay PK, et al. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8⁺ T-cell exhaustion in HIV infection. *Blood*. 5 mai 2011;117(18):4805-15.
115. Angelosanto JM, Blackburn SD, Crawford A, Wherry EJ. Progressive Loss of Memory T Cell Potential and Commitment to Exhaustion during Chronic Viral Infection. *J Virol*. août 2012;86(15):8161-70.
116. 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*. 28 juin 2012;16(3):R112.

117. Spec A, Shindo Y, Burnham C-AD, Wilson S, Ablordeppey EA, Beiter ER, et al. T cells from patients with Candida sepsis display a suppressive immunophenotype. *Crit Care Lond Engl*. 20 janv 2016;20:15.
118. Chen C-W, Mittal R, Klingensmith NJ, Burd EM, Terhorst C, Martin GS, et al. Cutting Edge: 2B4-Mediated Coinhibition of CD4(+) T Cells Underlies Mortality in Experimental Sepsis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2 août 2017;
119. Konkel JE, Frommer F, Leech MD, Yagita H, Waisman A, Anderton SM. PD-1 signalling in CD4+ T cells restrains their clonal expansion to an immunogenic stimulus, but is not critically required for peptide-induced tolerance. *Immunology*. mai 2010;130(1):92-102.
120. Delves PJ, Burton DR, Martin SJ, Roitt IM. *Les fondements de l'immunologie*. De Boeck Supérieur; 2008. 496 p.

Annexes :

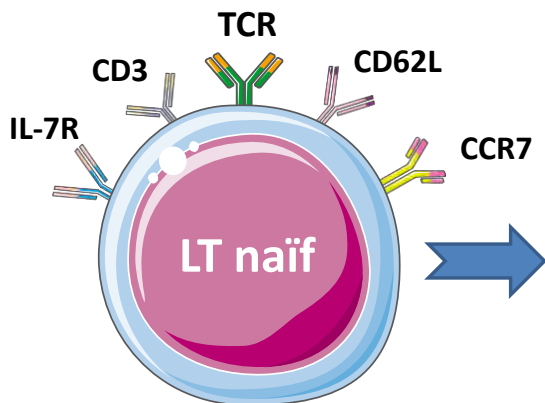


Annexe 1 : Complexité du réseau de cytokines autour des cellules de l'immunité innée et adaptative. Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby (23)

Cytokine	Origine	Fonctions
Interleukines		
IL-1 Interleukine 1	Immunité innée : Mono/macrophages, DCs, C. épithéliales, endothéliales, LB, NK	Pro-inflammatoire (endothélium vasculaire, induction de chimiokines). Induit la production de cytokines : IL-2 (LT), IL-1, 6, 8, TNF, GM-CSF (macrophages). Fièvre (hypothalamus). Synthèse de protéines de la phase aiguë (foie).
IL-2 Interleukine 2	Immunité adaptative : Lymphocytes T _H 1 et NK	Activation et prolifération LT, NK et prolifération LB. Augmente la cytotoxicité des NK et lyse par macrophages. Induit l'apoptose : mort cellulaire programmée.
IL-4 Interleukine 4	Immunité adaptative : LT _H 2, macrophages et mastocytes	Favorise réponse LT _H 2/T _H 1 (diminue synthèse IL-12). Facteur de croissance et différenciation LB. Augmente le CMH de classe II. Favorise le switch isotypique IgE et IgG1 et la synthèse de récepteurs aux IgE.
IL-5 Interleukine 5	Immunité adaptative : LT _H 2 et mastocytes	Facteur de prolifération éosinophile et B activés. Favorise le switch isotypique IgA.
IL-6 Interleukine 6	Immunité innée : Mono/macrophages, DCs, C. endothéliales	Influence d'immunité adaptative : favorise prolifération lignée B et sécrétion d'anticorps. Fièvre (hypothalamus). Synthèse de protéines de la phase aiguë (foie).
IL-8 Interleukine 8	Immunité innée : Mono/macrophages, C. endo	Chimiotaxie et activation neutrophiles. Recrutement PN et LT aux sites infectieux.
IL-10 Interleukine 10	Immunité innée et adaptative : LT _H 2 et LB, mono/macrophages	Inhibe réponse Th1 et réponse cellulaire cytotoxique en général. Diminue l'expression du CMH II et la sécrétion de cytokines par les mono/macrophages et DCs. Inhibe la prolifération des LT et favorise la différenciation des LB
IL-12 Interleukine 12	Immunité innée : Mono/macrophages, DCs, LB	Cytokine essentielle pour la prolifération des T _H 1. Augmente la production d'IFN-γ par LT _H 1, TCD8+, LTγδ, NK. Augmente la cytotoxicité des NK et TCD8+
IL-17 Interleukine 17	Immunité adaptative : LT _H 17 (famille de LT helpers)	Interviennent à l'interface de l'immunité innée et adaptative en favorisant la libération de cytokines pro-inflammatoire et cytokines mobilisant les neutrophiles (IL-6, CXCL-8, G-CSF) IL-17E favorise la réponse T _H 2 et inhibe la réponse T _H 17
Interférons		
IFN-α et β Interférons α et β	Immunité innée : Mono/macrophages, DCs, cellules infectées par des virus. IL-17E	Inhibe la réplication virale dans la plupart des cellules nucléées. Augment l'expression du CMH de classe I. Activation des NK
IFN-γ Interféron γ	Immunité adaptative : Lymphocytes T _H 1, CD8+ et NK	Inhibe certains effets de l'IL-4 et la prolifération des T _H 2. Induit la différenciation T _H 1. Inhibe la réplication virale. Augmente l'expression du CMH de classe I et II. Activation des macrophages et augmentation de la présentation de l'antigène. Favorise switch isotypique IgG2.
Tumor necrosis factor		
TNF-α Tumor necrosis factor Cachectine	Immunité innée : Mono/macrophages, mastocytes, DCs, neutrophiles, LT _H , NK, CTL	Pro-inflammatoire (endothélium vasculaire, induit la sécrétion de cytokines : IL-1, 6, 8). Synthèse de protéines de la phase aiguë (foie). Anti-tumoral, antiviral, antiparasitaire. Perte musculaire et grasseuse (cachexie). Apoptose de nombreux types cellulaires. Activation des neutrophiles.
Facteurs de croissance		
TGF-β Tumor growth factor β	Immunité innée et adaptative : LTet LB, mono/macrophages	Anti-inflammatoire : inhibition de la prolifération et fonction effectrices LT et LB. Inhibe fonctions macrophages. Favorise switch isotypique IgA. Favorise réparation tissulaire. Pro-inflammatoire : chimiotaxie mono/macrophages.
CSF GM-/G-/M-CSF	Macrophages, c. endo et épithéliales, fibroblastes, mastocytes, stroma MO	Stimulent la croissance, différenciation, prolifération des différents progéniteurs des lignées myéloïdes. Activation des macrophages

Chimiokines		
Chimiokines 4 familles : CXC, CC, CX3C, C.	Immunité innée : Mono/macrophages, DCs, neutrophiles, fibroblastes, LT, hépatocytes	Pro-inflammatoire, migration leucocytaire suivant un gradient de concentration : recrutement des cellules circulantes sur le site inflammatoire. Prolifération cellulaire et angiogénèse.

Annexe 2 : Cytokines d'intérêt, familles, origines et principales fonctions. Il existe de nombreuses cytokines, et sont listées ici à titre d'illustration certaines des cytokines les plus représentatives. Chaque cytokine présente de nombreuses fonctions et l'inventaire réalisé dans ce tableau est non exhaustif. De même seulement les principales cellules sécrétrices de cytokines sont citées ici. (23)(120).



LT naïf (CD4 ou 8) $\alpha\beta$ TCR

Phénotype :

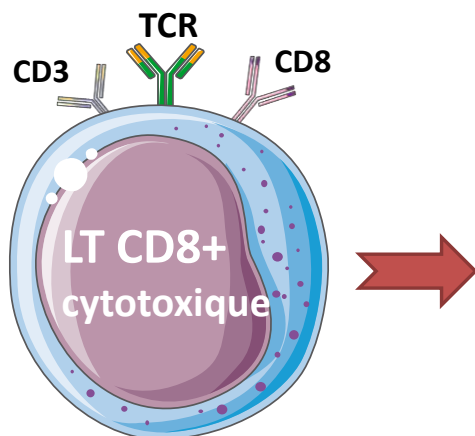
$\alpha\beta$ TCR / CD3 / CD4 ou 8 / CCR7 / CD62L hi / CD127 (IL-7R)

Facteur de transcription :

CD4+ : THPOK / CD8+ : RUNX3

Fonctions :

Patrouillent dans les ganglions en attente de la présentation d'un Ag par les CPA puis se différencient en lymphocytes T effecteurs ou mémoires.



LT CD8+ cytotoxique

Phénotype :

$\alpha\beta$ TCR / CD3 / CD8

Facteur de transcription :

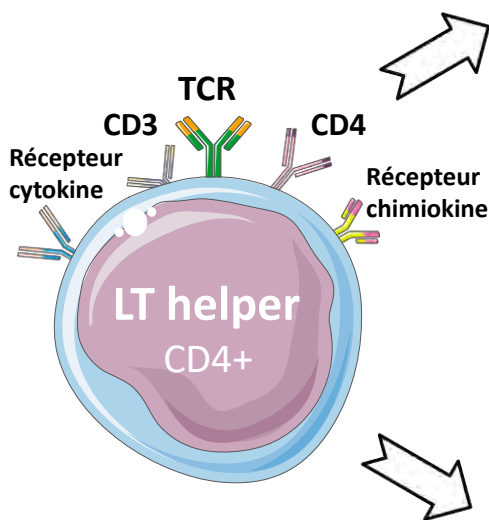
EOMES, T-bet, BLIMP1

Molécules effectrices sécrétées :

Perforine, granzyme, IFN γ .

Fonctions :

Cytotoxicité vis-à-vis des cellules infectées ou dénaturées. Immunité anti-infectieuse (virus ++) et anti-tumorale



LT_H1

Phénotype :

$\alpha\beta$ TCR, CD3, CD4, IL-12R, IFN γ R, CXCR3

Facteur de transcription :

T-bet, STAT4, STAT1

Molécules effectrices sécrétées :

IL-2, IFN γ

Fonctions :

Immunité cellulaire (contre les pathogènes intracellulaires). Recrutement des macrophages grâce à la sécrétion d'IFN γ . Développement régulé par l'IL-12.

LT_H2

Phénotype :

$\alpha\beta$ TCR, CD3, CD4, IL-4R, IL-33R, CCR4, IL-17RB, CRTH2

Facteur de transcription :

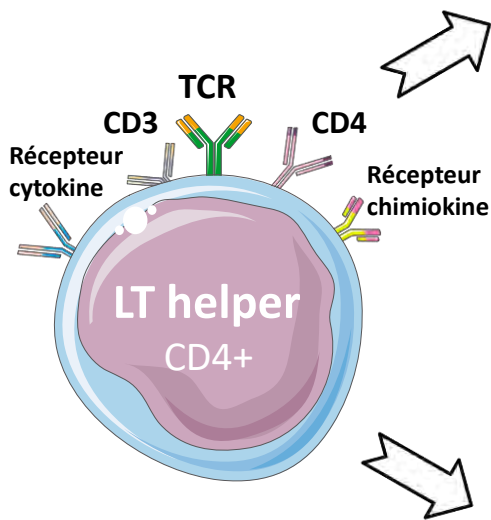
GATA3, STAT6, DEC2, MAF

Molécules effectrices sécrétées :

IL-4, IL-5, IL-13, IL-10

Fonctions :

Immunité humorale (extracellulaire, antihelminthique). Rôle dans l'allergie et l'asthme. Développement et maintien régulé par IL-4, IL-25 et IL-33



LT_H17

Phénotype :

$\alpha\beta$ TCR, CD3, CD4, IL-23R, CCR6, IL-1R, CD161

Facteur de transcription :

ROR γ t, STAT3, ROR α

Molécules effectrices sécrétées :

IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, CCL20

Fonctions :

Immunité antibactérienne et antimycosique (extracellulaires) à la surface des muqueuses. Rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires. Générés en présence de TGF- β et IL-6 et/ou IL-21 et maintenus grâce à IL-23 et IL-1.

LT_{FH}

Phénotype : $\alpha\beta$ TCR, CD3, CD4, CXCR5, SLAM, OX40L, CD40L, ICOS, IL-21R, PD1

Facteur de transcription :

BCL-6, STAT3

Molécules sécrétées :

IL-21

Fonctions : Formation des centres germinatif. Réponse LB

LT_H9

Phénotype :

$\alpha\beta$ TCR, CD3, CD4

Facteur de transcription :

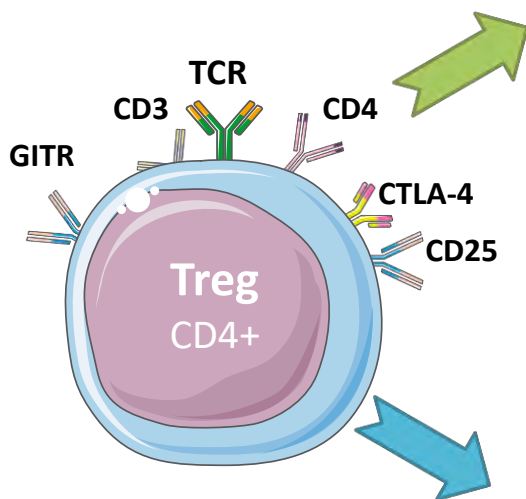
PU.1

Molécules sécrétées :

IL-9, IL-10

Fonctions :

Antihelminthique (extracellulaires)



LT régulateurs (n et iTregs)

Phénotype :

$\alpha\beta$ TCR, CD3, CD4, CD25, CTLA4, GITR

Facteur de transcription :

FOXP3, STAT5

Molécules effectrices sécrétées :

IL-10, TGF- β , IL-35 (nTreg)

Fonctions :

Immunosuppression et tolérance via de mécanismes contact dépendant et indépendants. Générés dans le thymus (nTregs) ou en périphérie (iTregs) à partir de LT naïfs sous l'influence du TGF- β et de l'IL-2.

Tr1

Phénotype :

$\alpha\beta$ TCR, CD3, CD4

Facteur de transcription :

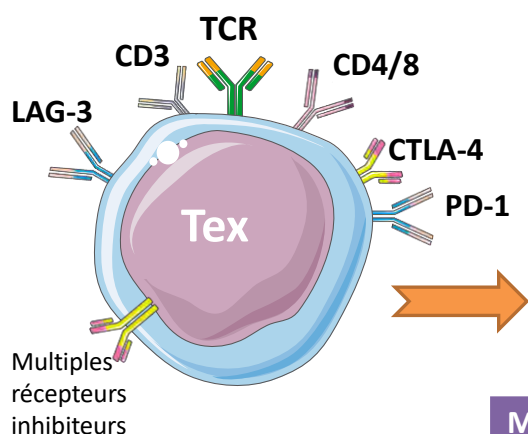
Pas connu

Molécules effectrices sécrétées :

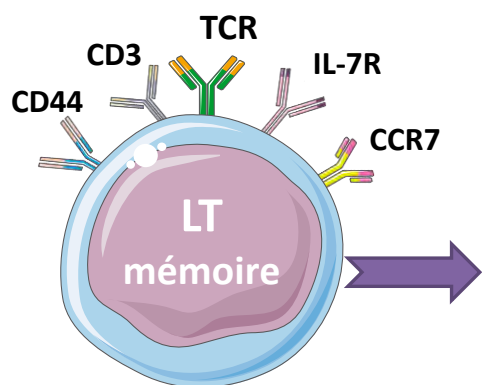
IL-10

Fonctions :

Immunosuppression médiée par l'IL-10. Génération à partir de LT naïfs en présence de TGF- β et de l'IL-27



LT épuisés (exhausted)
Phénotype : CD3, CD8 (ou 4), récepteurs inhibiteurs: PD1, TIM3, 2B4, LAG-3, CTLA-4, etc.
Facteur de transcription : BLIMP-1
Fonctions : Générés en réponse à une stimulation prolongée du TCR à un antigène. Expriment de multiples récepteurs inhibiteurs et perdent progressivement leurs fonctions effectrices.



Mémoire central : T _{CM}	Mémoire effecteur : T _{EM}
Phénotype : CD45RO ^{hi} , CD45RA ^{low} , CCR7 ^{hi} , CD44, CD62L ^{hi} , TCR, CD3, IL-7R (CD127), IL-15R	Phénotype : CD45RO ^{hi} , CD45RA ^{low} , CD62L ^{low} , CD44, TCR, CD3, IL-7R (CD127), IL-15R, CCR7 ^{low}
Facteur de transcription : BCL-6, BCL-6B, MBD2, BMI1	Facteur de transcription : BLIMP-1
Molécules sécrétées : IL-2, CD40L, IL-4, IFN γ , IL-17 en petites quantités	Molécules sécrétées : Cytokines pro-inflammatoires en grande quantité
Fonctions : Efficace de la réponse secondaire	Fonctions : Efficace de la réponse secondaire

Annexe 3 : Lymphocytes T : phénotypes, facteurs de transcription et fonctions des principales sous-populations résumés en schémas

T cells : the usual subsets. Chen Dong et Gustavo J. Martinez (56)

Receptor or Ligand on T cell	Superfamily	Cellular Expression pattern	T cell expression	Binds	Costimulatory or Inhibitory
CD28	Ig (CD28 family)	T cells	Constitutive on Naïve	B7.1, B7.2	Costimulatory
ICOS	Ig (CD28 family)	T cells, NKT cells, NK cells	Induced upon activation	ICOSL (B7RP1)	Costimulatory
CD40L	TNF/TNFR	T cells	Induced upon activation	CD40	Costimulatory
OX40	TNF/TNFR	T cells	Induced upon activation	OX40L	Costimulatory
4-1BB	TNF/TNFR	T cells, DC subset, FDCs, eosinophils, NK cells	Induced upon activation	4ABBL	Costimulatory
CD27	TNF/TNFR	T cells, NK cells, B cells	Constitutive on Naïve	CD70	Costimulatory
LIGHT	TNF/TNFR	T cells, monocytes, NK cells, immature DC	Induced upon activation	HVEM	Costimulatory
CTLA4	Ig (CD28 family)	T cells	Induced upon activation	B7.1/B7.2	Inhibitory
PD-1	Ig (CD28 family)	T cells, NKT cells, B cells monocytes	Induced upon activation	PD-L1/PD-L2	Inhibitory
PD-L1	Ig (CD28 family)	T cells, NKT cells, B cells monocytes, DC, endothelial cells, hepatocytes, etc.	Constitutive and upregulated upon activation	B7-1	Inhibitory
BTLA	Ig (CD28 family)	T cells, B cells, DC (macs + NK in B6 mice only)	Constitutive on Naïve	HVEM	Inhibitory
CD160	Ig	HVEM and MHCI (low affinity)	Induced upon activation	HVEM	Inhibitory
TIM3	Ig	T cells, macs, DCs	Induced upon activation	GALECTIN 9, phosphatidyl serine	Inhibitory
2B4	Ig (CD2 family)	T cells, NK cells, dendritic epidermal T cells, monocytes	Induced upon activation	CD48	Costimulatory and Inhibitory
LAG3	Ig	T cell, NK cells, B cells	Induced upon activation	MHC-II	Inhibitory
CD200R	Ig	T cells, macrophages, DCs, neutrophils, basophils, mast cells	Constitutive on Naïve	CD200	Inhibitory?
PIR-B	?	T cell, B cells, DCs	?	MHC-I	Inhibitory
NKG2A	C-lectin	T cells, NK cells	Induced upon activation	Oa-1 ^b , non-classical MHC-I, stress induced molecules (e.g. Rae-1, MICA, MICB)	Inhibitory
Ly49 family (mice)	C-lectin	T cells, NK cells, NK T cells monocytes/macrophages	?	MHC-I	Costimulatory and Inhibitory
KIRs (human)	Ig	T cells	Induced upon activation	HLA-I	Inhibitory
GP49B	Ig	T cells, macrophages, neutrophils, and NK cells, mast cells	?	$\alpha_v\beta_3$	Inhibitory

Annexe 4 : Expression de récepteurs co-stimulateurs et inhibiteurs sur les lymphocytes T.

Crawford A. et Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. (2009)

Septic shock patients immune profile in french ICU

Toulouse, 21st September 2017

SUMMARY

Background: septic syndromes (sepsis and septic shock) remain one of the leading causes of death in ICU. Despite improvement in management, complications and later mortality still persist. Initial infection worsening, secondary / nosocomial infections or viral reactivation appearance, seem to be related to an immune system failure.

Immune checkpoint inhibitors, targeted therapeutics whose goal is to restore immune functions, are developed in both infectious and malignant diseases.

A better understanding of the mechanisms that lead to this immune system failure seems to be essential and could lead to develop early markers of this sepsis-related immunosuppression which could enable the rapid introduction of these targeted therapies.

Our hypothesis was that the competence of the immune system had an impact on the clinical course of septic shock patients. The objective of the study was therefore to draw the immune profile of septic shock patients and to correlate them with their clinical parameters.

Methods: this study was conducted prospectively, between May 2015 and December 2016, on a cohort of 80 septic shock patients in ICU in Toulouse university hospital. An immune profile of T cells (ICP expression and lymphocyte populations and Tregs blood count) was determined in each of these patients at day 1, day 3 and day 7 by flow cytometry.

Findings: 2B4 is the main ICP expressed on CD8 T cells described in our study. The co-expression levels of 3 ICPs (2B4, PD1 and CD160) allow to define 4 patient profiles with significantly different survival rates. Especially, there is a significant decrease in survival for patients who expressed PD-1 (alone or co-expressed with 2B4) on CD8 T cells activation. PD-1 is the main ICP expressed on CD4 T cells described in our study. The co-expression levels of 3 ICPs (2B4, PD1 and CD160) allow to define 3 patient profiles. The CD4 T cells profiles do not appear to correlate either to specific CD8 T cells profiles or to prognosis.

Interpretation: to our knowledge, it is the first time that a significant association between PD-1 expression on CD8 T cells and a pejorative prognosis is highlighted in a cohort of septic shock patients. Only few patients seem to show a deep T cell exhaustion and antigen exposure may have been too short to induce lymphocyte dysfunction at the sampling time. It could be interesting to carry out a similar study on a larger cohort maybe with a sample taken at least 3 weeks from the shock and associated with a lymphocyte functions study (proliferative and secretive ability). A parallel study of phagocytic cells and innate immunity, in the first line during sepsis anti-bacterial response, could also be relevant.

KEY WORDS : SEPTIC SHOCK, T CELL EXHAUSTION, IMMUNE CHECKPOINTS, CO-INHIBITORY RECEPTORS, PD-1, CD160, 2B4, REGULATORY T CELLS

UNIVERSITE PAUL SABATIER, TOULOUSE III, Faculté des Sciences Pharmaceutiques,
35 chemin des maraîchers, 31062, TOULOUSE cedex 09 - France

Supervisor : Docteur François VERGEZ

Profil immunitaire des patients de réanimation en choc septique

Toulouse, le 21 septembre 2017

Introduction : Les syndromes septiques (sepsis, choc septique) demeurent l'une des principales causes de mortalité en service de réanimation. Malgré une amélioration de la prise en charge, des complications et une mortalité tardive persistent. L'aggravation de l'infection initiale, la survenue d'infections secondaires ou de réactivations virales, semblent être les conséquences d'un échec du système immunitaire.

Des inhibiteurs d'immunes checkpoints (ICPs), thérapeutiques ciblées visant à restaurer les fonctions immunitaires, voient le jour tant dans des situations infectieuses que malignes.

Dans ce contexte, il apparaît désormais important de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à cet état d'immunosuppression liée au sepsis et de disposer de marqueurs permettant d'améliorer la prise en charge de ces patients et la mise en place rapide de ces thérapeutiques ciblées. Notre hypothèse de travail était que la compétence du système immunitaire avait un impact sur l'évolution clinique des patients en choc septique. L'objectif de l'étude était donc de dresser le profil immunitaire des patients atteints de sepsis et de le corrélérer à leurs paramètres cliniques.

Matériel et méthodes : Cette étude prospective a été menée sur une cohorte de 80 patients admis dans un service de réanimation du CHU de Toulouse entre mai 2015 et décembre 2016 pour choc septique. Un profil immunitaire des populations lymphocytaires T (expression d'ICPs, quantification du taux de Tregs) a été établi chez chacun de ces patients lors du diagnostic de choc septique puis au 3^{ème} et 7^{ème} jour, par cytométrie en flux.

Résultats : 2B4 est l'ICP que l'on retrouve le plus souvent exprimé par les lymphocytes T CD8⁺ des patients de notre cohorte. Les niveaux de co-expression de 3 ICPs (2B4, PD1 et CD160) permettent de définir 4 profils de patients avec des taux de survie significativement différents. Notamment, l'expression de PD1, seul ou associé à 2B4, par les lymphocytes T CD8⁺ apparaît comme un facteur péjoratif. PD1 est l'ICP le plus exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ des patients de notre cohorte. Les niveaux d'expression de 2 ICPs (PD1 et 2B4) permettent de définir 3 profils de patients. Les profils T CD4⁺ ne semblent pas corrélérer ni à des profils T CD8⁺ particuliers, ni à un pronostic.

Conclusion : Notre étude est à notre connaissance la première à mettre en évidence une association significative entre l'expression de PD-1 sur les LT CD8⁺ et un pronostic péjoratif pour les patients admis pour sepsis en service de réanimation. Dans notre cohorte, peu de patients semblent présenter un état d'épuisement lymphocytaire profond et il est possible que l'exposition aiguë à l'antigène ait été trop brève pour induire des dysfonctions lymphocytaires franches et précoces. Il pourrait être intéressant de compléter notre étude sur une cohorte plus étendue avec un profilage à distance du choc associé à une étude des fonctions lymphocytaires. Une étude parallèle des cellules phagocytaires de l'immunité innée, en première ligne de la réponse anti-bactérienne lors du sepsis, pourrait aussi être pertinente.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : BIOLOGIE MEDICALE

MOTS-CLES : CHOC SEPTIQUE, EPUISEMENT LYMPHOCYTAIRE, IMMUNE CHECKPOINTS

UNIVERSITE PAUL SABATIER, TOULOUSE III, Faculté des Sciences Pharmaceutiques,
35 chemin des maraîchers, 31062, TOULOUSE cedex 09 - France

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur François VERGEZ