



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

**Travail effectué dans le Laboratoire d'Immunologie de l'Hôpital Edouard Herriot
Sous la direction de Monsieur le Docteur Guillaume MONNERET**

Soutenu devant le jury interrégional le 21 Septembre 2012

Par Madame **Astrid VILLARS née MECHIN**

Née le 18 Mai 1986 à Lyon 9^e (69)

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 Septembre 1990, tient lieu de

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**INTERET DE L'INTERLEUKINE-7
CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CHOC SEPTIQUE :
APPROCHES OBSERVATIONNELLE ET FONCTIONNELLE**

JURY

PRESIDENT : Professeure Christine VINCIGUERRA

MEMBRES : Professeur Charles DUMONTET
Docteur Carole SCHWEBEL
Docteur Olivier DAUWALDER
Docteur Guillaume MONNERET

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université

M. A. BONMARTIN

Vice-Président du Conseil Scientifique

M. Jean-François MORNEX

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. Daniel SIMON

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est

Directeur : M. Jérôme ETIENNE

UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux

Directeur : M. François-Noël GILLY

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

UFR d'Odontologie

Directeur : M. Denis BOURGEOIS

Institut des Techniques de Réadaptation

Directeur : M. Yves MATILLON

Département de formation et centre de recherche
en Biologie Humaine

Directeur : M. Pierre FARGE

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. Fabien DE MARCHI

UFR de Sciences et Techniques des Activités

Physiques et Sportives (STAPS)

Directeur : M. Claude COLLIGNON

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)

Directeur : M. Pascal FOURNIER

I.U.T. LYON 1

Directeur : M. Christian COULET

Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)

Directrice : M. Jean Claude AUGROS

I.U.F.M.

Directeur : M. Régis BERNARD

Septembre 2011

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon
Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA
Directeurs Adjointes : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD

Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

• **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Jean-François SABOT (Pr)
Monsieur Alain BANNIER (MCU)
Monsieur Philippe BERNARD (MCU)
Mademoiselle Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Raphaël TERREUX (MCU – HDR)
Monsieur Pierre TOULHOAT (PAST)

• **PHARMACIE GALENIQUE - COSMETOLOGIE**

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)
Madame Valérie BERTHOLLE (MCU)
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU)
Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)
Madame Karine PORET-PADOIS (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

• **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Monsieur Henri DECHAUD ((MCU - PH - HDR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

• **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Mademoiselle Valérie SIRANYAN (MCU)

• **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

Septembre 2011

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **HYGIENE, ENVIRONNEMENT ET BIOSECURITE**

Monsieur Dominique TREPO (MCU - PH - HDR)

- **DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)

Monsieur François COMET (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU - HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Roland BARRET (Pr)

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Anne-Emmanuelle DE BETTIGNIES (MCU)

Madame KERZAON Isabelle (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Christelle MOUCHOUX (AHU)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Catherine RIOUFOL (MCU)

Septembre 2011

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

• TOXICOLOGIE

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Madame Léa PAYEN (MCU - HDR)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (AHU)

• PHYSIOLOGIE

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Monsieur Alain BATAILLARD (MCU - HDR)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

• PHARMACOLOGIE

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Jean-Marie VAUGEOIS (Pr)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL-CHATELAIN (MCU - HDR)
Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

• IMMUNOLOGIE

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Paul ROUZAIRE (AHU)

• HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

• MICROBIOLOGIE et MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
Madame Emilie FROBERT (AHU)
Madame Marie-Andrée MAZOYER (MCU - HDR)
Mme Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)

Septembre 2011

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Madame Anne-Françoise PETAVY (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU)
Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (Pr)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU)
Monsieur Bruno MATHIAN (MCU – PH - HDR)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Madame Marie VILLEDIEU (MCU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)
Madame Valérie VOIRON (PAST)

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mademoiselle Natalie CARTISER	85 ^{ème} section
Monsieur Waël ZEINYEH	86 ^{ème} section
Monsieur Antony ZOROPOGUI	87 ^{ème} section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Septembre 2011

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

Madame le Professeur Christine Vinciguerra, vous me faites l'honneur de présider ce jury. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect. Merci également pour votre passion pour l'enseignement et la recherche que vous avez su me transmettre lors de nos rencontres.

Monsieur le Professeur Charles Dumontet, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Madame le Docteur Carole Schwebel, vous avez accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Olivier Dauwalder, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci également pour ton soutien sur ce projet et tes conseils scientifiques.

Monsieur le Docteur Guillaume Monneret, je vous remercie particulièrement d'avoir encadré ce travail et de m'avoir transmis votre passion pour la recherche et l'immunologie. Merci pour votre grande disponibilité, vos enseignements, votre rigueur scientifique et vos compétences. Que cette thèse soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon admiration.

A l'équipe du laboratoire d'immunologie

Fabienne, je te remercie pour ton encadrement sur ce projet. Travailler avec toi m'a beaucoup appris, à la fois sur le plan technique, scientifique et humain. Merci pour ta rigueur scientifique, tes conseils et ta bonne humeur. Que cette thèse soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon admiration.

Anne-Perrine, je te remercie d'avoir continué le travail sur le projet IL-7. Merci également pour ton aide apportée pour l'organisation des COP, j'imagine que nous en garderons un souvenir ému !

Merci à *Anne, Caroline, Julie et Julien*, pour votre aide à la fois technique, scientifique et statistique et pour les bons moments passés ensemble. Merci à *Françoise, Christophe et Julien*, pour vos précieux conseils et vos enseignements en immunologie. Merci à *Cathy*, à mes co-internes, *Anthony et Cécile*, et aux techniciens, *Agnès, Brigitte, Claude, Françoise, Patrick et Sandrine*, pour votre soutien, votre aide et votre bonne humeur quotidienne.

J'ai beaucoup apprécié ces 18 mois passés en compagnie de toute l'équipe, j'espère qu'au fil des années ce "petit" labo gardera son intégrité et sa bonne ambiance !

Aux services de réanimation du Centre Hospitalier Lyon Sud

Monsieur le Docteur Alain Lepape, merci pour votre contribution à ce travail qui est le fruit d'une collaboration entre les services cliniques et le laboratoire. Merci également aux attachées de recherche clinique pour leur aide précieuse dans le recueil des données cliniques.

A l'unité mixte HCL-Biomérieux du Centre Hospitalier Lyon Sud

Je remercie *Catherine Ott et Laurence Becquart* pour leur aide à la réalisation des dosages d'IL-7 plasmatique par la technique Luminex.

A l'unité mixte HCL-Biomérieux de l'Hôpital Edouard Herriot

Aux internes rencontrés pendant ces quatre ans et demi.

A mes parents, pour votre soutien tout au long de ces études. Merci pour votre aide, vos conseils et tout ce que vous m'avez transmis.

A mes sœurs, *Sophie, Cécile, Madeline, Charlotte et Lou*.

A mes amis

Anne-Gaëlle, Auriane, Charlotte, Julien, Nathalie et Nicolas, Fabien et Pauline, Laurence et Antony, Sophie et Pierre-Henri, Claire et Arnaud, Audrey et Romain, Anne et Yves-Eric, Vic et François, merci les amis pour les bons moments partagés ces dernières années, j'espère qu'il y en aura beaucoup d'autres ! Je pense notamment au TMB, aux matchs de badminton et de tennis endiablés, aux pistes de ski, aux barbecues sauvages, aux apéros, aux soirées bien arrosées, à Lyon, à Chamonix ou à Millery, etc.

DEDICACES

A *Arthur*, merci pour le bonheur que tu nous procures chaque jour.

A *Clément*, les mots ne suffisent pas pour te remercier, malgré tout, merci pour tout l'amour que tu me portes, merci pour ta présence, ton soutien et pour les précieux conseils que tu m'as donnés pour la réalisation de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1. INTRODUCTION.....	2
2. LES SYNDROMES SEPTIQUES.....	3
2.1. Définitions.....	3
2.2. Épidémiologie.....	4
2.3. Physiopathologie du choc septique.....	8
2.4. Diagnostic du choc septique.....	15
2.5. Prise en charge thérapeutique du choc septique.....	16
2.6. Conclusion.....	22
3. EVOLUTION DES CONNAISSANCES DE LA PHYSIOPATHOLOGIE.....	23
3.1. Mécanismes anti-inflammatoires de compensation.....	23
3.2. Conséquences sur le système immunitaire.....	27
3.3. Chronologie des réponses pro et anti-inflammatoires.....	32
4. INTERLEUKINE-7.....	37
4.1. Structure de l'interleukine-7.....	37
4.2. Lieux de production de l'interleukine-7.....	38
4.3. Récepteur de l'interleukine-7.....	38
4.4. Voies de signalisation Interleukine-7/CD ₁₂₇	42
4.5. Fonctions biologiques de l'interleukine-7.....	44
4.6. Interleukine-7 recombinante humaine.....	47
TRAVAIL PERSONNEL.....	54
1. INTRODUCTION.....	55
2. MATERIELS ET METHODES.....	56
2.1. Patients.....	56
2.2. Protocole d'étude.....	56
2.3. Dosage de l'IL-7.....	57
2.4. Expression cellulaire du CD ₁₂₇	59
2.5. Dosage du CD ₁₂₇ soluble.....	61
2.6. Prolifération lymphocytaire.....	62
2.7. Analyse statistique des résultats.....	64
3. RESULTATS.....	65
3.1. Patients.....	65
3.2. IL-7 plasmatique.....	66
3.3. Expression du CD ₁₂₇ sur les leucocytes.....	69

3.4.	<i>CD₁₂₇ soluble</i>	71
3.5.	<i>Prolifération lymphocytaire</i>	75
4.	DISCUSSION	77
4.1.	<i>Approche observationnelle</i>	77
4.2.	<i>Approche fonctionnelle</i>	80
4.3.	<i>Conclusion</i>	82
5.	CONCLUSIONS	83
BIBLIOGRAPHIE		86
ANNEXE		92

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : INTERRELATION SCHEMATIQUE ENTRE SRIS, SEPSIS ET INFECTION D'APRES BONE <i>ET AL.</i> [1]	4
FIGURE 2 : MORTALITE DES SYNDROMES SEPTIQUES AUX ETATS-UNIS EN 2002 [6]	5
FIGURE 3 : REPARTITION DES DEPENSES POUR LA PRISE EN CHARGE D'UN PATIENT EN REANIMATION ATTEINT DE SEPSIS SEVERE [8]	6
FIGURE 4 : INCIDENCE ET MORTALITE LIEE AU SEPSIS EN FONCTION DE L'AGE ET DU SEXE [11]	7
FIGURE 5 : EVOLUTION DES CAS DE SEPSIS AUX ETATS-UNIS EN FONCTION DU MICROORGANISME EN CAUSE [7]	7
FIGURE 6 : DE LA BACTERIE A LA PATHOLOGIE [17]	12
FIGURE 7 : SURVIE ASSOCIEE A LA RAPIDITE DE MISE EN PLACE DE L'ANTIBIOTHERAPIE CHEZ LES PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE [27] ...	17
FIGURE 8 : HEMOFILTRATION PAR "CYTOKINESE" [31]	20
FIGURE 9 : CONNEXIONS ENTRE LES SYSTEMES NERVEUX ET IMMUNITAIRE [46]	25
FIGURE 10 : VOIE DE STIMULATION DU L _T VIA LE TCR ET SES PRINCIPALES VOIES CO-STIMULATRICES OU CO-INHIBITRICES [57]	29
FIGURE 11 : REPRESENTATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE AU COURS DU SEPSIS [63]	32
FIGURE 12 : MOLECULES CAPABLES DE RESTAURER L'IMMUNITE POST-SEPTIQUE [67].	34
FIGURE 13 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'INTERLEUKINE-7 [77]	37
FIGURE 14 : SITES DE PRODUCTION DE L'INTERLEUKINE-7 D'APRES SASSON [78]	38
FIGURE 15 : DOMAINES DE LA CHAINE ALPHA DU RECEPTEUR DE L'IL-7 [80]	39
FIGURE 16 : DIFFERENCES D'EXPRESSION DU CD ₁₂₇ SELON LE STADE DE MATURATION LYMPHOCYTAIRE [84]	40
FIGURE 17 : PROMOTEUR DU GENE DE LA CHAINE ALPHA DU RECEPTEUR DE L'IL-7 [82]	41
FIGURE 18 : REGULATEURS DE L'EXPRESSION CELLULAIRE DU CD ₁₂₇ [82]	41
FIGURE 19 : VOIES DE SIGNALISATION DE L'IL-7 VIA LE CD ₁₂₇ D'APRES [81]	43
FIGURE 20 : DIVERSIFICATION DU REPERTOIRE T SOUS L'EFFET DE L'IL-7 [84]	45
FIGURE 21 : RESTAURATION DE LA DIVERSITE DU REPERTOIRE T SOUS L'EFFET DE L'IL-7 [91]	52
FIGURE 22 : MECANISMES D'ACTION POSSIBLES D'UNE IMMUNOTHERAPIE PAR L'IL-7 CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CANCER [91]	53
FIGURE 23 : PROTOCOLE D'ETUDE	57
FIGURE 24 : REACTION SE DEROULANT A LA SURFACE DE LA BILLE MAGNETIQUE LORS DU DOSAGE DE L'IL-7	58
FIGURE 25 : EVALUATION DE L'EXPRESSION DU CD ₁₂₇ SUR LES DIFFERENTES POPULATIONS DE L _T CD ₄	60
FIGURE 26 : EVALUATION DE L'EXPRESSION DU CD ₁₂₇ SUR LES L _T CD ₈	60
FIGURE 27 : DOSAGE DU CD ₁₂₇ SOLUBLE PAR ELISA	62
FIGURE 28 : QUANTIFICATION DES PBMC APRES FICOLL (P = LYMPHOCYTES + MONOCYTES)	63
FIGURE 29 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'IL-7 EN PG / ML CHEZ LES PATIENTS A J1-2 (CS J1-2) ET A J3-4 (CS J3-4) ET CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (VS)	66
FIGURE 30 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'IL-7 EN PG / ML CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CS A J1-2 ET A J3-4 ET CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (VS), EN TENANT COMPTE DE LA SURVENUE OU NON D'UNE IN.	67
FIGURE 31 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'IL-7 EN PG / ML CHEZ LES PATIENTS A J1-2 ET A J3-4 ET CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (VS), EN TENANT COMPTE DE LA MORTALITE.	68
FIGURE 32 : CORRELATIONS ENTRE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE D'IL-7 EN PG / ML ET LE NOMBRE DE L _T CD ₄ EN CELLULES / μL A J1-2 ET A J3-4	68

FIGURE 33 : EXPRESSION DU CD ₃ SUR LES LYMPHOCYTES EXPRIMANT LE CD ₁₂₇	69
FIGURE 34 : INTENSITE MOYENNE DE FLUORESCENCE (IMF) DU CD ₁₂₇ SUR LES LYMPHOCYTES CD ₄ ⁺ CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CS A J1-2 (CS J1-2) ET A J3-4 (CS J3-4) ET CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (VS).....	70
FIGURE 35 : INTENSITES MOYENNES DE FLUORESCENCE (IMF) DU CD ₁₂₇ SUR LES LYMPHOCYTES CD ₈ ⁺ CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CS A J1-2 (CS J1-2) ET A J3-4 (CS J3-4) ET CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (VS)	70
FIGURE 36 : POURCENTAGES DE LY CD ₈ ⁺ EXPRIMANT LE CD ₁₂₇ PARMI LES LY CD ₈ ⁺ CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CS A J1-2 (CS J1-2) ET A J3-4 (CS J3-4) ET CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (VS).....	71
FIGURE 37 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE sCD ₁₂₇ EN NG / ML CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CS A J1-2 (CS J1-2) ET A J3-4 (CS J3-4) ET CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (VS)	72
FIGURE 38 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE sCD ₁₂₇ EN NG / ML CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CS A J1-2 ET A J3-4 ET CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (VS), EN TENANT COMPTE DE LA SURVENUE OU NON D'IN.	73
FIGURE 39 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE sCD ₁₂₇ EN NG/ML CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CS A J1-2 ET A J3-4 ET CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (VS), EN TENANT COMPTE DE LA MORTALITE.	74
FIGURE 40 : CORRELATIONS ENTRE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE DE sCD ₁₂₇ EN NG/ML ET LE NOMBRE DE L _T CD ₄ EN CELLULES/ μ L A J1-2 ET A J3-4.	74
FIGURE 41 : REPONSE PROLIFERATIVE LYMPHOCYTAIRE DES PATIENTS ATTEINTS DE CHOC SEPTIQUE (BLEU) ET DES VOLONTAIRES SAINS (BLANC) SELON DIFFERENTES CONDITIONS.	76
FIGURE 42 : COMPARAISON DU <i>RATIO</i> DE PROLIFERATION EN REPONSE A UNE STIMULATION DU TCR EN PRESENCE OU EN L'ABSENCE D'IL-7RH.	76

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : CRITERES CLINIQUES DU SYNDROME DE REPONSE INFLAMMATOIRE SYSTEMIQUE D'APRES BONE <i>ET AL.</i> [1]	3
TABLEAU 2 : PAMPS ET DAMPS ET LEURS RECEPTEURS D'APRES OPAL [15].....	10
TABLEAU 3 : SCORE SOFA (<i>SEQUENTIAL ORGAN FAILURE ASSESSMENT</i>) SELON VINCENT [24]	15
TABLEAU 4 : POLYMORPHISMES GENETIQUES DES PATIENTS ATTEINTS DE SEPSIS OU D'INFECTION A MENINGOCOQUE D'APRES COHEN [48]	26
TABLEAU 5 : MOLECULES POUVANT RETABLIR LES FONCTIONS IMMUNITAIRES AU COURS DU SEPSIS D'APRES OPAL [15] ET MONNERET [42]	34
TABLEAU 6 : ESSAIS CLINIQUES UTILISANT L'INTERLEUKINE-7 REFERENCES SUR LE SITE CLINICALTRIALS.GOV	49
TABLEAU 7 : DONNEES CLINIQUES ET PARAMETRES IMMUNOLOGIQUES MESURES A J3-4 APRES LE DEBUT DU CHOC.	65

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide aminé
ACCP/SCCM	<i>American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	Protéine kinase B
APACHE	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
CD	Cluster de différenciation
sCD₁₂₇	CD ₁₂₇ soluble
CIVD	Coagulation intra-vasculaire disséminée
CLP	<i>Caecal Ligature and Punction</i> ou Ligature et ponction caecale
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice de l'antigène
CS	Choc septique
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen - 4</i>
DAMPs	<i>Danger-associated molecular patterns</i>
DC	Cellules dendritiques
DICS	Déficit immunitaire combiné sévère
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ET	Endotoxine tolérance
FBS	Sérum de veau fœtal
FLT-3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IL-7Rα	Chaîne alpha du récepteur de l'IL-7 = CD ₁₂₇
IL-7rh	Interleukine 7 recombinante humaine
IL1-RA	Récepteur antagoniste de l'Interleukine 1
IMF	Intensité moyenne de fluorescence
IN	Infection nosocomiale
Ly	Lymphocyte
L_B	Lymphocyte B
L_{NK}	Lymphocyte NK
L_T	Lymphocyte T
LPS	Lipopolysaccharide = endotoxine
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	Oxyde nitrique
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>

PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> ou Cellules mononucléées du sang
PBS	Tampon phosphate salin
PC5	Phycoérythrine - Cyanine 5
PD-1	<i>Programmed Death - 1</i>
PE	Phycoérythrine
PIP2	Phosphatidyl-inositol diphosphate
PIP3	Phosphatidyl-inositol triphosphate
PN	Polynucléaire neutrophile
PRRs	<i>Pathogen recognition receptors</i>
RTEs	Récents émigrants du thymus
SAPS II	<i>Simplified Acute Physiologic Score II</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
SRIS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Th	<i>T helper</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> ou Récepteur cellulaire T
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VS	Volontaire sain

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION

D'après la *Global Sepsis Alliance* (www.globalsepsisalliance.org), les syndromes septiques forment un ensemble de pathologies gravissimes atteignant 18 millions de personnes par an dans le Monde, et correspondant à 10 000 morts par jour. Ils représentent la première cause de mortalité dans les services de réanimation malgré les nombreux efforts réalisés ces vingt dernières années pour identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Par ailleurs, leur coût considérable, d'environ 17 milliards de dollars par an dans le Monde, fait de ces syndromes un problème majeur de santé publique. Le choc septique (CS) en est la forme la plus grave, dont la mortalité peut atteindre 40 à 70 % selon les études.

L'immunosuppression qui touche les patients atteints de CS est corrélée à un risque accru de survenue d'infection nosocomiale (IN) et à une mortalité plus élevée. Les thérapies immunostimulantes sont maintenant considérées dans les syndromes septiques comme potentiel traitement adjuvant, et des essais cliniques commencent à apparaître. Le traitement par l'interleukine (IL)-7 s'est montré efficace dans d'autres situations cliniques, notamment dans le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), où les dysfonctions lymphocytaires sont comparables à celles observées chez les patients atteints de CS.

Dans ce document, une revue de la littérature est d'abord présentée. Elle expose les syndromes septiques, l'évolution des connaissances de leur physiopathologie et l'intérêt potentiel de l'IL-7 comme traitement immunomodulateur du CS. La deuxième partie, qui constitue notre travail, présente les résultats d'une étude préclinique évaluant la voie de signalisation de l'IL-7 et de son récepteur chez des patients en CS.

2. LES SYNDROMES SEPTIQUES

Dans cette partie, nous évoquerons tout d'abord les définitions des syndromes septiques ainsi que leur épidémiologie, puis nous invoquerons leur physiopathologie, leur diagnostic ainsi que leur prise en charge thérapeutique actuelle.

2.1. DEFINITIONS

La conférence de consensus de l'*American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)*, a défini les critères correspondant aux syndromes septiques, permettant une stratification des patients selon leur gravité et facilitant ainsi leur prise en charge thérapeutique [1].

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) est défini par la présence d'au moins deux des manifestations présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Critères cliniques du syndrome de réponse inflammatoire systémique d'après Bone *et al.* [1]

Température centrale	> 38°C ou < 36°C
Fréquence cardiaque	> 90 battements par minute
Fréquence respiratoire	> 20 cycles respiratoires par minute ou PaCO ₂ < 32 mm Hg
Numération des globules blancs	> 12 ou < 4 G/L, ou > 10 % granuleux immatures

Le SRIS peut se rencontrer dans de nombreuses situations non infectieuses telles que la pancréatite aiguë, l'ischémie, le choc hémorragique, ou chez les patients polytraumatisés. On parle alors d'inflammation stérile. Une complication fréquente du SRIS est la survenue de dysfonctions d'organes (*e.g.* insuffisance respiratoire aiguë, défaillance cardiovasculaire, rénale, *etc.*) pouvant aller jusqu'au syndrome de défaillance multi viscérale.

Les syndromes septiques seront définis ci-dessous par ordre de sévérité croissante, du sepsis simple, au CS.

Le sepsis correspond à l'association d'un SRIS à une infection prouvée ou non par la mise en évidence de microorganismes dans des tissus normalement stériles. Le sepsis englobe plusieurs situations cliniques et physiopathologiques de sévérités variables : on parle de **sepsis sévère** lorsque le sepsis est associé à une dysfonction d'organe, une anomalie d'hypoperfusion (*i.e.* acidose lactique, oligurie, altération aiguë de l'état mental, *etc.*) ou une hypotension induite par le sepsis (*i.e.* pression artérielle systolique inférieure à 90 mm Hg ou réduite de plus de 40 mm Hg sans autre cause d'hypotension).

Le CS, sous-ensemble du sepsis sévère, est défini par la présence d'une hypotension induite par le sepsis persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat.

Ces définitions sont schématisées dans la Figure 1. Elles sont largement utilisées en pratique, notamment comme base de critères d'inclusion dans de nombreux essais cliniques. Elles sont en outre régulièrement réévaluées lors de conférences de consensus et restent pour l'instant inchangées.

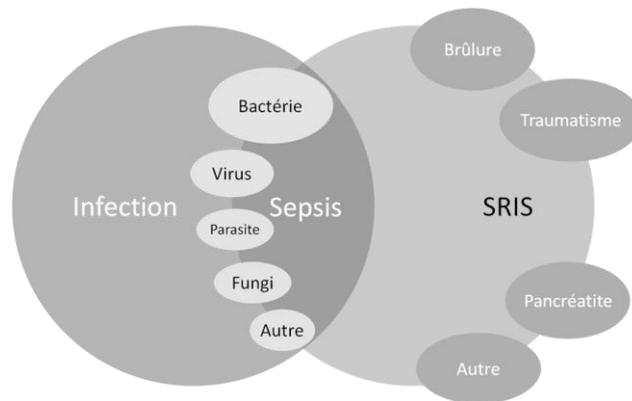


Figure 1 : Interrelation schématique entre SRIS, sepsis et infection d'après Bone *et al.* [1]

En 2001, une conférence internationale a tenté d'améliorer ces définitions afin de permettre une meilleure stratification des patients dans les études cliniques, et peut-être une meilleure compréhension de la physiopathologie des états septiques. Les experts se sont basés non seulement sur des paramètres cliniques, mais également sur des marqueurs biologiques. La conférence a abouti à un schéma de classification associant signes cliniques et biomarqueurs, appelé PIRO, prenant en considération les facteurs de Prédiposition des patients, la nature de l'Infection, la Réponse de l'hôte, et le degré de dysfonction d'Organe. Néanmoins, ce score PIRO n'est toujours pas utilisé en pratique clinique [2].

2.2. ÉPIDEMIOLOGIE

Les syndromes septiques représentent la première cause d'hospitalisation et de mortalité dans les services de réanimation, ce qui en fait un problème majeur de santé publique [3].

Au cours de ces quinze dernières années, la mortalité liée au CS et au sepsis sévère n'a que faiblement diminué [4]. Comme représentée dans la Figure 2, la sévérité des syndromes septiques est proportionnelle à leur mortalité, qui est de l'ordre de 25 à 30 % pour le sepsis sévère, et qui peut atteindre jusqu'à 40 à 70 % chez les patients en CS [5]. En revanche, les syndromes les plus sévères restent les moins fréquents.

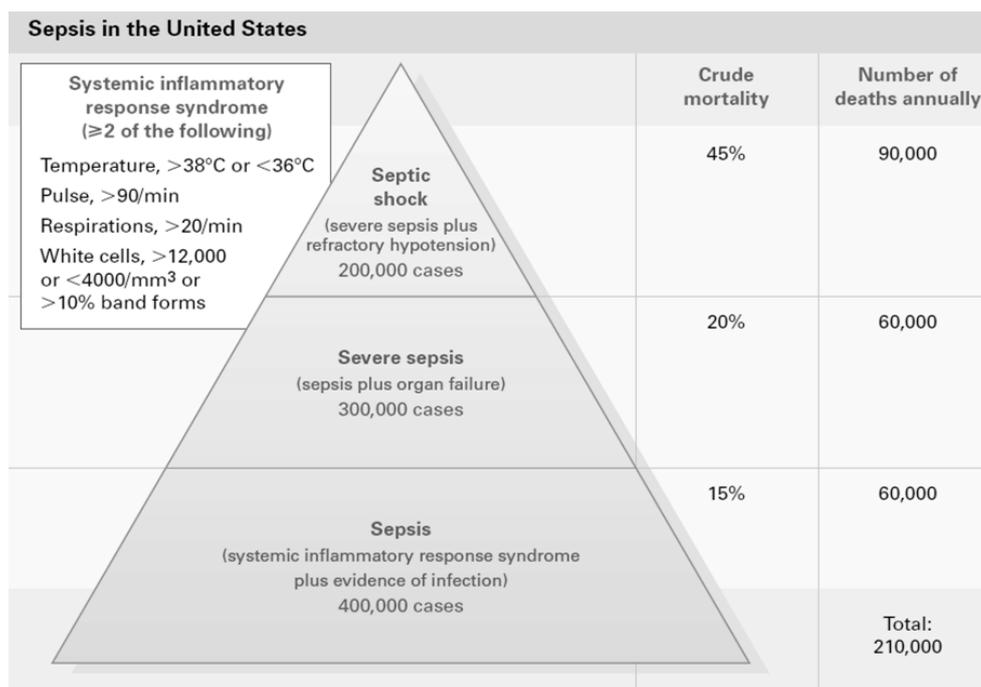


Figure 2 : Mortalité des syndromes septiques aux Etats-Unis en 2002 [6]

L'incidence des syndromes septiques est en constante augmentation. Aux Etats-Unis, entre 1979 et 2000, elle est passée de 83 à 240 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants, correspondant à une augmentation annuelle de 8,7 % [7]. En France, en 2001, l'incidence du sepsis sévère a été estimée à 95 cas pour 100 000 habitants [4].

Les raisons de l'incidence croissante sont multiples : la meilleure connaissance des syndromes septiques a déjà contribué à une hausse du nombre de cas diagnostiqués. Néanmoins, la réelle augmentation de l'incidence des états septiques peut s'expliquer par l'utilisation croissante de molécules immunosuppressives (*e.g.* chimiothérapies anticancéreuses ou post-transplantation), par l'augmentation des procédures chirurgicales invasives, ainsi que par l'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques. D'autre part, la meilleure prise en charge des comorbidités et le vieillissement de la population contribuent également à ce phénomène [7].

2.2.1. Coût de prise en charge d'un patient septique

Les syndromes septiques génèrent des dépenses importantes. Les patients admis pour un sepsis sévère dans les services de réanimation représentent un coût moyen de 26 000 € en Europe, contre 34 000 € aux Etats-Unis. Cependant, les patients qui ne sont pas hospitalisés en soins intensifs représentent un coût de 12 000 €. Cette différence est principalement liée à la durée d'hospitalisation (23,3 j en moyenne en réanimation contre 15,6 j dans les services de médecine) ainsi qu'aux dépenses elles-mêmes qui sont beaucoup plus importantes dans les services de

réanimation. Selon une étude regroupant plusieurs pays de l'hémisphère nord (Canada et sept pays d'Europe), le coût moyen d'une journée d'hospitalisation en réanimation pour un patient atteint de sepsis sévère est estimé à 1200 € [8].

La Figure 3 représente la répartition des dépenses pour la prise en charge d'un patient en réanimation atteint de sepsis sévère.

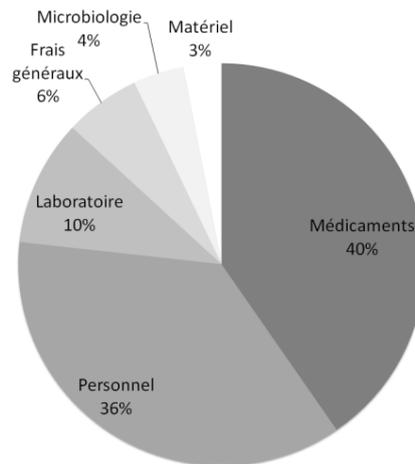


Figure 3 : Répartition des dépenses pour la prise en charge d'un patient en réanimation atteint de sepsis sévère [8]

Les facteurs représentant un coût élevé sont multiples : en premier lieu, on peut noter la survenue d'IN, qui engendre une dépense trois fois plus importante [9, 10]. Les autres facteurs engendrant un coût plus élevé sont l'origine chirurgicale, l'âge (60 à 64 ans), et le décès du patient. On note également que l'augmentation du coût est liée au nombre de dysfonctions d'organes (particulièrement lorsque le patient présente une défaillance cardiaque), à un score APACHE II > 25 (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) et à la présence d'un CS [10].

2.2.2. Démographie

Après la première année de vie, l'incidence du sepsis augmente avec l'âge [11]. L'âge moyen des patients atteints de sepsis est de 60 ans [3], et il augmente progressivement avec le temps dans l'étude de 1979 à 2000 de Martin *et al.*

Le *sex-ratio* est légèrement en défaveur de l'homme (50 à 60 % des cas) [3, 11-13], avec, en plus, un âge de survenue chez l'homme légèrement plus faible que chez la femme (*cf.* Figure 4) [7, 11].

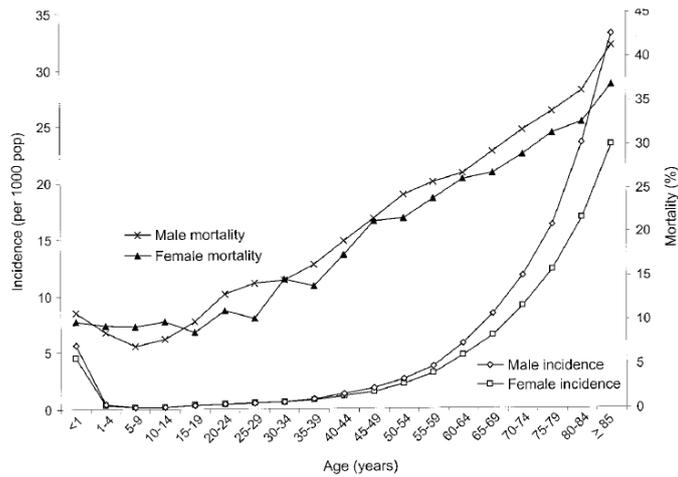


Figure 4 : Incidence et mortalité liée au sepsis en fonction de l'âge et du sexe [11]

2.2.3. Étiologies

Les infections retrouvées dans les états septiques peuvent être d'origine communautaire ou nosocomiale, chacune représentant environ 50 % des cas [3, 4], et de nature médicale (60 à 70 % des cas) ou chirurgicale (30 à 40 % des cas) [3, 4, 12].

Les points d'appel infectieux sont multiples, bien que la majorité des sepsis soient d'origine pulmonaire (de 45 à 67 % selon les études). La deuxième cause de sepsis est constituée par les infections abdominales (environ 25 %), puis viennent ensuite les infections urinaires et les bactériémies primitives [3, 4, 11, 12, 14].

L'écologie microbienne des syndromes septiques a évolué au cours de ces dernières années, comme l'indique la Figure 5. Les microorganismes sont nombreux : on retrouve des bactéries dans la majorité des cas, mais également des virus, parasites, champignons, etc. De 1979 à 1987, aux Etats-Unis, les bactéries à Gram négatif étaient rencontrées majoritairement, puis ont progressivement laissé place aux bactéries à Gram positif, qui sont devenues prépondérantes entre 1987 et 2000 [7].

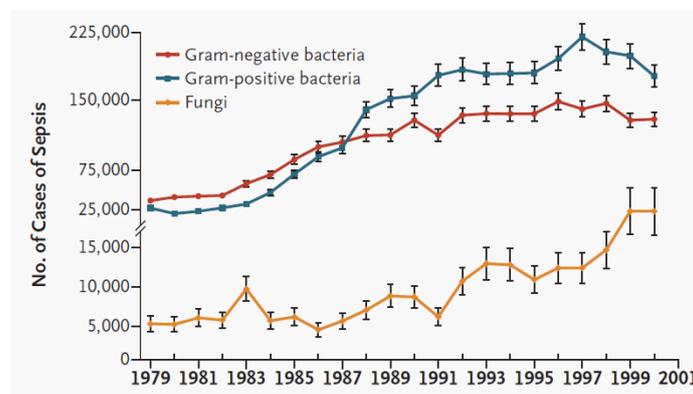


Figure 5 : Evolution des cas de sepsis aux Etats-Unis en fonction du microorganisme en cause [7]

Selon une autre étude de Martin *et al.* publiée en 2009, regroupant les données de 12 492 patients entre 2002 et 2005, provenant de 37 pays, les bactéries à Gram négatif représentaient 57 % des germes retrouvés chez les patients atteints de sepsis sévère, contre 45 % de bactéries à Gram positif et 12 % d'agents fongiques [3]. Enfin, une étude européenne réalisée en 2002 a rapporté une faible majorité de bactéries à Gram positif (40 %), contre 38 % de bactéries à Gram négatif et 17 % de champignons [12]. L'étude la plus récente, regroupant 7 087 patients recrutés sur l'ensemble du globe, recense une majorité d'infections à bactéries à Gram négatif (62 %), accompagnées de 47 % d'infections à bactéries à Gram positif et 19 % d'infections fongiques [14].

Parmi les bactéries à Gram négatif, les espèces les plus fréquemment retrouvées sont *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les bactéries à Gram positif sont représentées majoritairement par *Staphylococcus aureus*. L'espèce fongique retrouvée de façon prédominante est *Candida albicans* [3, 7, 12, 14].

2.3. PHYSIOPATHOLOGIE DU CHOC SEPTIQUE

2.3.1. Phase précoce de l'infection et reconnaissance des microorganismes

La première étape est constituée par l'entrée d'un agent pathogène (bactérien par exemple) au niveau d'un site habituellement stérile. Les cellules du soi, par détection de la présence de l'agent étranger, vont alors initier une réponse inflammatoire. Cette étape se fait grâce à la reconnaissance de motifs particuliers présents chez les microorganismes par les cellules phagocytaires de l'organisme.

2.3.1.1. Motifs moléculaires associés aux pathogènes

Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), aussi bien les macrophages que les cellules dendritiques (DC), participent à cette première phase par reconnaissance de *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), motifs microbiens conservés présents à la surface d'un grand nombre de bactéries (*e.g.* le lipopolysaccharide (LPS) présent sur la paroi des bactéries à Gram négatif), de champignons et de virus. Les tissus endommagés par l'attaque de l'agent infectieux, expriment eux aussi des motifs pouvant être reconnus par les CPA, on parle alors de *Danger-associated molecular patterns* (DAMPs) [15].

Ces PAMPs et DAMPs sont reconnus par les *Pathogen recognition receptors* (PRRs) présents à la surface des CPA, qui en réponse, vont sécréter des médiateurs de la réaction inflammatoire. En effet, les macrophages sont polarisés vers un phénotype M1 qui conduit à la production de médiateurs

pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le *Tumor necrosis factor* (TNF) et l'IL-6, ainsi que des chimiokines comme l'IL-8 [15-17].

2.3.1.2. Pathogen recognition receptors

La principale famille de PRRs est constituée par les *Toll-like receptors* (TLR) qui peuvent reconnaître des molécules de la paroi bactérienne (lipoprotéines, LPS, acides lipoteichoïques, flagelline...), des molécules de la paroi fongique, mais également des acides nucléiques viraux et bactériens. Les TLR sont des récepteurs transmembranaires de type I. Ils sont caractérisés par un domaine extracellulaire riche en leucine et un domaine intracellulaire TIR (*Toll-interleukin-1 receptor*) qui partage une forte homologie avec le domaine intracytoplasmique du récepteur de l'IL-1. Parmi les dix TLR différents qui ont été identifiés au sein du génome humain, c'est le TLR 4 qui a le rôle prépondérant dans cette phase de reconnaissance des microorganismes.

Les TLR peuvent être localisés soit au niveau de la membrane plasmique (TLR 1, 2, 4, 5 et 6), détectant ainsi les bactéries extracellulaires, soit au niveau des endosomes (TLR 3, 7, 8 et 9), reconnaissant alors les acides nucléiques des agents pathogènes. Ils sont exprimés à la fois sur les cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles (PN) et DC) et de l'immunité adaptative (lymphocytes, Ly), mais également sur les cellules épithéliales de l'épiderme, des épithéliums digestif et respiratoire, *etc.* Ils constituent ainsi la première ligne de défense anti-infectieuse [17-19].

Le niveau d'expression du TLR 4 peut être modulé par le LPS ou d'autres PAMPs. Son expression est augmentée chez les patients septiques par la présence de DAMPs et PAMPs en grande quantité [20].

Outre la famille des TLR, d'autres récepteurs participent à cette phase de reconnaissance des microorganismes comme le CD₁₄ monocytaire, des molécules du système complément (par la voie alterne et la voie des lectines) ou les protéines Nod (Nod₁ et Nod₂).

Le Tableau 2 regroupe les différents motifs tissulaires ou pathogènes pouvant être reconnus par les CPA *via* différents PRRs.

Tableau 2 : PAMPs et DAMPs et leurs récepteurs d'après Opal [15]

(ADN : acide désoxyribonucléique, ARN : acide ribonucléique, HMGB₁ : *high mobility group box 1*, NOD : *nucleotide oligomerisation domain*, OMP : *outer membrane protein*, RAGE : *receptor for advanced glycation end products*, RLH : *retinoic acid-inducible gene-1-like helicase*, TLR : *Toll-like receptor*)

Récepteur	Source	Pathogen recognition receptors
PAMPs bactériens		
LPS	Bactérie à Gram négatif	CD14, MD-2/TLR4
Acides lipoteichoïques	Bactérie à Gram positif	CD14, TLR2/TLR6
Peptidoglycanes	Bactérie à Gram négatif/positif	CD14, TLR2, NOD1, NOD2
Lipopeptides triacyl	Bactérie à Gram négatif/positif	TLR1/TLR2
Lipopeptides diacyl	<i>Mycoplasma spp.</i>	TLR2/TLR6
Porines, OMPs	<i>Neisseria spp.</i>	TLR2
Flagelline	Bactéries mobiles flagellées	TLR5
PAMPs viraux		
Génomés viraux	Virus à ARN	RLH
ARN double brin	Virus à ARN double brin	TLR3
ARN simple brin	Virus à ARN simple brin	TLR7/TLR8
Protéines virales	Virus à ARN ou à ADN	TLR2/TLR4
PAMPs fongiques		
Phospholipomannanes	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannanes	<i>Candida, Aspergillus spp.</i>	TLR4
Glucanes	<i>Candida, Aspergillus spp.</i>	TLR2/dectin-1
DAMPs		
Protéines S100	Hôte	TLR4, RAGE
HMGB1	Hôte	TLR4, TLR2, RAGE
Protéines de choc thermique	Hôte	TLR4
Fibrinogène, fibronectine	Hôte	TLR4
Hyaluronanes	Hôte	TLR4
Hème	Hôte	TLR4

2.3.2. Cascade immuno-inflammatoire

La reconnaissance des PAMPs et des DAMPs par les PRRs des CPA entraîne la sécrétion de nombreux médiateurs pro-inflammatoires. Il en découle l'instauration d'un processus inflammatoire au départ localisé à la zone infectée puis, une exacerbation du phénomène va provoquer un SRIS. L'inflammation consiste en un recrutement de cellules inflammatoires au niveau du site infectieux qui vont sécréter de nombreux médiateurs, on parle d'orage cytokinique.

2.3.2.1. Recrutement des cellules inflammatoires

Afin d'aider à éradiquer l'agent pathogène, les cellules de l'inflammation sont recrutées au niveau du site infectieux. Les cytokines sécrétées par les cellules inflammatoires résidentes vont stimuler la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Ainsi, les globules blancs circulants vont se lier de façon transitoire aux cellules endothéliales pour passer au niveau tissulaire par diapédèse. Parmi les cellules recrutées dans les tissus, on retrouve d'une part des cellules phagocytaires (PN et macrophages) mais également des cellules de l'immunité adaptative (Ly) [16].

Les cellules phagocytaires vont entraîner la destruction directe des agents pathogènes. La première étape de cette destruction implique la phagocytose de la bactérie. Elle est facilitée par le processus d'opsonisation : des anticorps et des fragments du complément vont aller recouvrir les bactéries dès leur entrée au niveau d'un site stérile de l'organisme puis, les PRRs présents à la surface des PN vont reconnaître ces protéines (*e.g.* par des récepteurs du complément ou des récepteurs du fragment constant des immunoglobulines). La bactérie phagocytée est ensuite incluse dans une vacuole appelée phagosome qui va fusionner avec les granules des PN pour aboutir à sa destruction : en effet, le contenu des granules des PN a des propriétés antimicrobiennes, par la présence de défensines, de protéases antibactériennes (cathepsine G et élastase), de la myéloperoxydase et de protéines augmentant la perméabilité des bactéries [16].

Lors d'une agression bactérienne, la réponse immunitaire adaptative est déclenchée grâce aux interactions entre les CPA et les Ly : l'antigène microbien est présenté par les CPA aux Ly T (L_T) par l'intermédiaire du CD_3 et des molécules de costimulation (CD_2 , CD_{28} ...). Les $L_T CD_4$ effecteurs vont ensuite sécréter des cytokines comme l'interféron gamma ($IFN-\gamma$) qui va stimuler les cellules phagocytaires. Elles vont alors pouvoir détruire les bactéries et interagir avec les Ly B (L_B). De façon parallèle, les L_T activent l'expression du CD_{40} ligand, ce qui induit une fixation plus importante aux CPA par le CD_{40} . Il en découle un relargage d'IL-12 et le maintien de l'expression des molécules de costimulation, favorisant la communication entre les médiateurs de l'immunité innée et adaptative [16].

2.3.2.2. Orage cytokinique

L'activation des TLR après fixation de leurs ligands entraîne leur dimérisation et provoque l'activation de cascades de signalisation intracellulaire, par l'intermédiaire de molécules adaptatrices et *via* des protéines kinases. Ces cascades permettent la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qui vont entretenir la réaction inflammatoire.

L'interaction directe des molécules adaptatrices avec les TLR aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κB (*nuclear factor- κB*) qui va être transloqué au niveau nucléaire. NF- κB est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de plus de 150 gènes mais présente majoritairement des propriétés pro-inflammatoires. En effet, il induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF. La cascade faisant intervenir le facteur TRIF conduit quant à elle à la production d'interféron β .

Chez les patients septiques, on retrouve des concentrations sanguines élevées de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-1 β , l'IL-12, l'IL-18, l'IFN- γ , le GM-CSF (*Granulocyte*

macrophage colony stimulating factor), et l'IFN- β . Ces concentrations élevées sont synonymes d'un excès de production par les cellules de l'organisme en réponse à l'infection [17, 20].

Le TNF est impliqué dans de nombreuses réactions comme la migration leucocytaire, l'inflammation locale, l'activation des PN, la génération de la fièvre, la suppression de l'érythropoïèse et la diminution de la synthèse des acides gras et de l'albumine [21].

De façon simultanée, des cytokines anti-inflammatoires sont secrétées pour contrôler la réaction inflammatoire, protégeant ainsi l'individu du sepsis et du choc à l'endotoxine. Cette sécrétion est médiée par des molécules cytoplasmiques ou membranaires qui vont inhiber la cascade de signalisation. On retrouve ainsi, chez les patients septiques, des concentrations sanguines importantes de certaines cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-10, le TGF- β (*Transforming growth factor*), l'IFN- α , l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-13 [17, 20, 22].

Si l'équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est rompu, une diffusion va se produire dans tout l'organisme pour contribuer à un état général d'immunosuppression ou de syndrome inflammatoire (cf. Figure 6).

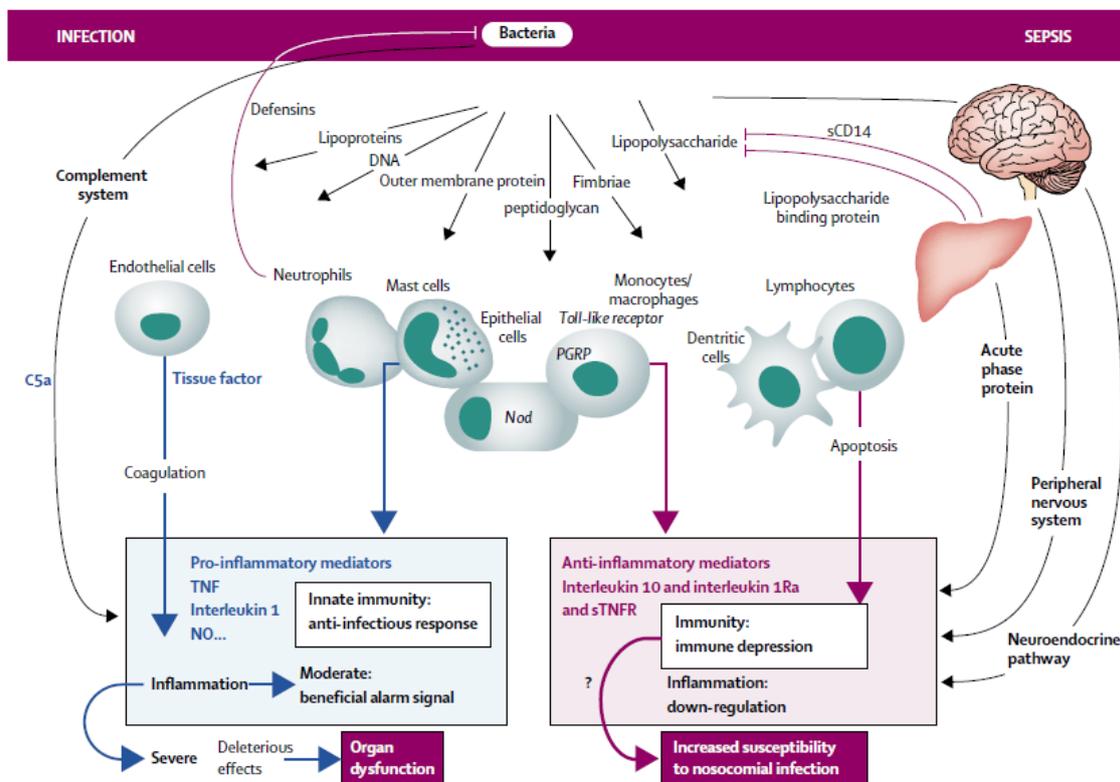


Figure 6 : De la bactérie à la pathologie [17]

L'exacerbation du processus inflammatoire va engendrer les nombreuses défaillances tissulaires retrouvées chez les patients atteints de CS.

2.3.2.3. Défaillances tissulaires

Les défaillances d'organes retrouvées lors du CS sont expliquées par différents mécanismes résultant pour la plupart de la libération considérable de cytokines pro-inflammatoires dans l'organisme. Parmi ces mécanismes, nous détaillerons notamment l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'activation de la coagulation et le stress oxydatif.

2.3.2.3.1. *Augmentation de la perméabilité vasculaire*

Le sepsis s'accompagne de concentrations plasmatiques élevées d'histamine secrétée par les mastocytes et les polynucléaires basophiles en réponse à l'augmentation des anaphylatoxines (C3a et C5a) par activation du complément. Outre l'accroissement de la perméabilité vasculaire et de la contraction des cellules musculaires lisses, les anaphylatoxines augmentent également la migration cellulaire au niveau des tissus. [17]

Les cytokines pro-inflammatoires induisent la synthèse d'enzymes impliquées dans la production du facteur d'activation plaquettaire et des eicosanoïdes (phospholipase A₂, cyclo-oxygénase, 5-lipoxygénase et acétyltransférase). L'augmentation de ces facteurs favorise le processus inflammatoire, en altérant la vasomotricité et en augmentant le flux sanguin et la perméabilité vasculaire. [17]

Chez les patients atteints de CS, de grandes quantités d'Oxyde nitrique (NO) sont libérées après exposition au LPS et par stimulation de la NO-synthase inductible dans les tissus endommagés et les parois vasculaires. Cet excès de NO induit des lésions des micro vaisseaux, et une hypo réactivité vasculaire aboutissant à des défaillances d'organes, probablement par induction de l'apoptose. [17]

2.3.2.3.2. *Activation de la coagulation*

La cascade de coagulation est activée par une invasion microbienne systémique [20]. Il existe des connexions fortes entre la coagulation et le système immunitaire inné. Certains facteurs de la coagulation (la thrombine, le facteur dix activé et le complexe facteur tissulaire-facteur sept activé) peuvent stimuler la synthèse de cytokines et de chimiokines par activation des cellules endothéliales, des PN et des monocytes, *via* les récepteurs activés par les protéases. Ce phénomène est bénéfique pour l'organisme lors d'une infection localisée. Cependant, lors d'un syndrome inflammatoire généralisé comme dans le cas du CS, ce phénomène est délétère : la liaison incontrôlée des globules

blancs à la surface endothéliale entraîne des atteintes vasculaires au niveau des tissus et contribue à la défaillance microcirculatoire [15].

L'activation de la coagulation, la génération de thrombine et la progression vers la coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD) sont des complications bien connues chez les patients atteints de sepsis sévère. L'activation par la voie du facteur tissulaire en est la principale cause. Les facteurs de la phase contact sont également activés et entretiennent le phénomène de coagulation et de vasodilatation par génération de bradykinine. L'activation de la CIVD entraîne la formation de micro thrombi et contribue à la défaillance multi viscérale qui survient chez les patients septiques [15].

La déplétion en facteurs de la coagulation associée à l'activation des inhibiteurs de la coagulation (la plasmine, l'antithrombine et la protéine C) peut conduire à des hémorragies diffuses au stade final de CIVD [15].

2.3.2.3.3. *Stress oxydatif*

Les atteintes ischémiques et hémorragiques ne sont pas seules responsables des dysfonctions d'organes rencontrées au cours du CS. Des médiateurs comme le TNF, l'IL-1 α , le NO et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent inhiber la chaîne respiratoire mitochondriale et ainsi induire une hypoxie cellulaire et donc une diminution de leur production d'énergie.

Les ERO sont produites de façon naturelle par le corps. Les défenses anti-oxydantes permettent de rendre ces substances inoffensives. Lorsque la production d'ERO dépasse leur élimination, celles-ci s'accumulent et on parle de stress oxydatif. Parmi les ERO, l'anion super oxyde, produit par la NADPH oxydase, oxyde et altère les protéines et les acides gras insaturés des phospholipides. Il joue alors un rôle néfaste pour les cellules qui perdent leurs constituants principaux. Néanmoins, le stress oxydatif pourrait avoir un côté bénéfique car certains phospholipides oxydés peuvent empêcher l'inflammation induite par l'endotoxine en bloquant l'interaction entre le LPS et le CD₁₄, co-récepteur du TLR 4 [17].

Dans une étude publiée dans The Lancet en 2002, Brealey *et al.* ont montré une relation entre la sévérité du CS et le dysfonctionnement mitochondrial, la déplétion en adénosine triphosphate, la déplétion en glutathion (antioxydant intracellulaire) et la production de NO au niveau du muscle strié squelettique. Les 28 patients étudiés présentaient tous un sepsis sévère ou un CS et une ou plusieurs défaillances d'organes. La sévérité du choc dans cette étude a été évaluée par la quantité d'amines vasoactives nécessaires à maintenir une pression artérielle suffisante chez ces patients [23].

2.3.2.3.4. Défaillance multi viscérale

L'ensemble de ces phénomènes peut entraîner chez les patients en CS une défaillance de tous les organes (foie, rein, coeur, poumon, système nerveux central, etc.). La défaillance d'organe peut être évaluée chez les patients par le score SOFA (*Sequential organ failure assessment*), représenté dans le Tableau 3. La mortalité des patients est corrélée à ce score [24].

Tableau 3 : Score SOFA (*Sequential organ failure assessment*) selon Vincent [24]

*Agents vasopresseurs administrés au moins 1h (doses en µg/kg/min)

Score SOFA	1	2	3	4
Respiration (PaO_2/FiO_2 , mmHg)	< 400	< 300	< 200 --- avec aide respiratoire ---	< 100
Coagulation (plaquettes, G/L)	< 150	< 100	< 50	< 20
Foie (bilirubine, µmol/L)	20-32	33-101	102-204	> 204
Cœur (hypotension)	PA < 70 mmHg	Dopamine ≤ 5 ou dobutamine*	Dopamine > 5 ou épinéphrine ≤ 0,1	Dopamine > 15 ou épinéphrine > 0,1
Système nerveux central (Glasgow)	13-14	10-12	6-9	< 6
Rein (créatinine, µmol/L ou diurèse)	110-170	171-299	300-440 ou < 0,5 L/j	> 440 ou < 0,2 L/j

2.4. DIAGNOSTIC DU CHOC SEPTIQUE

Le diagnostic du CS doit être le plus précoce possible. Il comporte deux volets principaux : le diagnostic initial posé sur une forte suspicion clinique associée à des anomalies biologiques, qui sera par la suite appuyé d'un diagnostic microbiologique. Le problème majeur dans le diagnostic du sepsis réside dans l'absence de signes spécifiques, aussi bien au niveau clinique que biologique.

L'apparition des signes cliniques peut se faire de manière brutale ou plus progressive. Les symptômes du CS sont nombreux et peu spécifiques, ils correspondent avant tout aux critères de SRIS (fièvre ou hypothermie, tachycardie, hypo ou hyperventilation), auxquels s'ajoutent des signes de choc (hypotension, signes d'hypoperfusion ou de dysfonctions d'organes). Ces signes peuvent être confirmés par le bilan biologique initial : les anomalies observées vont dépendre des organes défaillants. D'une manière générale, des lactates et une procalcitonine élevés sont de bons marqueurs en faveur du diagnostic de CS.

A ces symptômes généraux s'associent des signes d'infection qui peuvent être très divers car influencés par de nombreux facteurs (e.g. virulence et charge infectante de l'agent pathogène, porte d'entrée, susceptibilité de l'hôte, etc.). Chez les patients où la cause infectieuse est moins évidente,

on pourra retrouver comme seul signe d'infection la fièvre ou une hypothermie, rendant le diagnostic plus difficile [5].

Le diagnostic microbiologique se fait dans un deuxième temps, de façon plus tardive, en raison du délai de rendu des résultats qui est souvent long (48 h environ). Les prélèvements destinés au diagnostic microbiologique doivent être réalisés avant la mise en place de l'antibiothérapie, ceci dans la mesure du possible, la réalisation de ceux-ci ne devant toutefois pas retarder la prise en charge thérapeutique du patient. Lorsque le point d'appel infectieux est évident, le prélèvement sera réalisé au niveau du site primaire de l'infection. A ces prélèvements seront associées des hémocultures, permettant dans la plupart des cas de mettre en évidence une dissémination hématogène de l'agent infectieux. Chez les patients sans point d'appel infectieux évident, des hémocultures seront prélevées lors des pics de fièvre afin de détecter une bactériémie ou une fongémie. Dellinger *et al.* recommandent de prélever au moins deux hémocultures, dont au moins une périphérique et une prélevée à travers chaque dispositif vasculaire, sauf si celui-ci a été introduit depuis moins de 48 h [25].

Il est indispensable d'identifier rapidement l'agent en cause et de déterminer sa sensibilité aux différents antibiotiques ou antifongiques pouvant être utilisés afin d'adapter le traitement initial instauré de façon probabiliste. En effet, plus le traitement antimicrobien est efficace rapidement et plus les chances de survie du patient sont élevées [26, 27].

2.5. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DU CHOC SEPTIQUE

En 2008, Dellinger *et al.*, dans le cadre de la *Surviving Sepsis Campaign*, ont mis au point un protocole international comportant des recommandations pour la prise en charge des patients présentant un CS. Celle-ci doit être mise en place le plus rapidement possible afin de contribuer aux meilleures chances de survie pour le patient [25].

Le traitement est tout d'abord constitué par l'éradication de l'agent infectieux en cause (élimination de la source et anti-infectieux ciblés pour chaque patient). Le traitement est ensuite symptomatique avec une réanimation intense (remplissage vasculaire, ventilation mécanique si nécessaire, *etc.*).

2.5.1. Traitement étiologique anti-infectieux

2.5.1.1. Élimination de la source

Il est important lors du CS d'identifier rapidement le foyer infectieux afin de pouvoir prendre les mesures nécessaires pour l'éliminer si cela est possible (e.g. par drainage d'un abcès, par élimination de tissus nécrosés infectés, par le retrait d'un dispositif médical infecté, etc.).

L'élimination du foyer infectieux doit être la moins invasive possible. Par exemple, on préférera enlever un abcès par voie percutanée plutôt que par drainage chirurgical. Il faudra également enlever tous les dispositifs intra vasculaires susceptibles d'être la source de l'infection, ceci le plus rapidement possible après avoir disposé de nouvelles voies d'abord.

Les interventions conduisant à l'ablation du foyer infectieux peuvent entraîner des complications comme des hémorragies, des fistules ou même des lésions d'organes involontaires. C'est ainsi que le choix de la meilleure méthode d'élimination de la source doit peser les bénéfices et les risques liés à l'intervention [25].

2.5.1.2. Antibiothérapie

L'instauration du traitement doit être effectuée dès la suspicion clinique et si possible, après réalisation des prélèvements en vue du diagnostic microbiologique.

Dellinger *et al.* recommandent une antibiothérapie intraveineuse dès la première heure après la suspicion du CS. En effet, à chaque délai d'une heure d'instauration de traitement antibiotique est associée une augmentation de la mortalité, comme l'indique la Figure 7 [27].

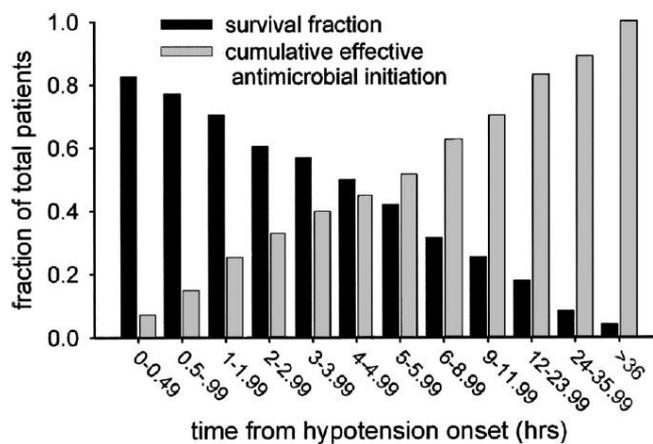


Figure 7 : Survie associée à la rapidité de mise en place de l'antibiothérapie chez les patients en choc septique [27]

L'antibiothérapie initiale est instaurée de manière empirique. Elle doit comporter une ou plusieurs molécules actives contre tous les agents pathogènes suspectés (bactériens et/ou fongiques) et capables de diffuser à des concentrations adéquates au niveau de la source présumée du sepsis. Le choix des antibiotiques est complexe et dépend de nombreux facteurs comme les antécédents du patient, notamment s'il présente des allergies médicamenteuses, l'existence d'une pathologie sous-jacente, le syndrome clinique (pneumopathie, méningite, etc.), et la sensibilité des agents pathogènes communautaires ou hospitaliers. Il faut dans tous les cas éviter de prescrire des antibiotiques récemment utilisés par le patient car le risque de développer des bactéries résistantes est alors plus important [25].

Les patients atteints de CS justifient l'instauration d'une antibiothérapie à large spectre jusqu'à ce que l'organisme en cause et sa sensibilité aux antibiotiques soient définis. Il est important d'administrer des fortes doses de ces antibiotiques afin d'assurer une bonne efficacité. Cependant, une surveillance pharmacologique est indispensable chez ces patients qui présentent souvent une insuffisance hépatique ou rénale ainsi qu'un volume de distribution perturbé en raison de la réanimation liquidienne agressive [25].

Il est recommandé de réévaluer le traitement antimicrobien chaque jour afin d'optimiser l'efficacité, d'empêcher le développement de résistances, de réduire la toxicité et le coût. Une désescalade vers l'antibiotique le plus approprié doit être réalisée dès que la bactérie et son antibiogramme sont connus [25].

2.5.2. Traitement symptomatique

2.5.2.1. Réanimation initiale

Une étude randomisée, contrôlée, monocentrique a montré que la mise en place d'une réanimation précoce et orientée améliore la survie des patients atteints de CS (*i.e.* diminution de la mortalité à 28 jours) [26].

La réanimation initiale doit être débutée dès que le diagnostic d'hypoperfusion est posé. Elle ne doit en aucun cas être différée en cas de retard d'admission en service de soins intensifs. Pendant les six premières heures de réanimation, les objectifs à atteindre sont une pression veineuse centrale entre 8 et 12 mm Hg, une pression artérielle moyenne supérieure à 65 mm Hg, une diurèse supérieure à 0,5 mL/kg/h et une saturation veineuse en oxygène supérieure à 70 % [25].

La réanimation initiale consiste en un remplissage vasculaire important associé à l'administration de vasopresseurs (catécholamines).

2.5.2.2. Remplissage

Le remplissage peut être effectué par administration de colloïdes ou de cristalloïdes naturels ou artificiels. Le remplissage avec les cristalloïdes nécessite une quantité de fluide plus importante qu'avec les colloïdes pour obtenir un effet similaire en raison de leur plus grand volume de distribution. De ce fait, ils entraînent plus d'œdèmes chez les patients traités. Les cristalloïdes sont cependant moins coûteux que les colloïdes.

L'objectif à atteindre par ce remplissage est une pression veineuse centrale supérieure à 8 mm Hg chez les patients non ventilés et supérieure à 12 mm Hg chez les patients sous ventilation artificielle [25].

2.5.2.3. Vasopresseurs

Les vasopresseurs sont administrés afin d'assurer le maintien d'une pression artérielle moyenne supérieure à 65 mm Hg, permettant de garder une perfusion tissulaire suffisante pour le fonctionnement des organes.

Le vasopresseur devant être utilisé en première intention peut être indifféremment la noradrénaline ou la dopamine. L'adrénaline est l'agent alternatif de premier choix en cas de CS "non répondeur" à la noradrénaline ou à la dopamine [25].

2.5.3. Thérapies adjuvantes

2.5.3.1. Corticostéroïdes

L'usage des corticostéroïdes à faible dose pour le traitement du CS a été apprécié dans plusieurs études dont les résultats sont contradictoires.

En 2002, Annane *et al.* ont mis en évidence, chez 300 patients en CS et présentant une insuffisance surrénalienne relative, l'efficacité d'un traitement de sept jours par des faibles doses d'hydrocortisone et de fludrocortisone. Cette étude a montré une réduction significative de la mortalité à 28 jours, sans augmentation d'effets indésirables par ce traitement [28].

Une étude de la même équipe publiée en 2008 vient contredire ces premiers résultats. En effet, sur 499 patients inclus dans l'étude, 251 dans le groupe traité et 248 dans le groupe recevant le placebo, les auteurs n'observent aucune différence de survie à 28 jours entre les groupes. Lorsqu'une répartition des patients est faite selon leur réponse de l'axe corticotrope (comme dans l'étude précédente), les résultats restent identiques avec aucune différence de survie des patients entre le

groupe de patients traités et le groupe de patients recevant le placebo [29]. Néanmoins, cette étude a montré une récupération plus rapide des organes défaillants chez les patients traités par corticostéroïdes par rapport aux patients recevant le placebo. La défaillance d'organes a été évaluée chez les patients par le score SOFA qui était équivalent dans les deux groupes de patients avant traitement. La baisse du score SOFA observée principalement chez les patients traités était liée majoritairement à la récupération cardiovasculaire et hépatique [30].

Les recommandations de 2008 consistent en une administration d'hydrocortisone intraveineuse uniquement chez les patients en CS dont la pression sanguine n'est améliorée ni par le remplissage vasculaire ni par les vasopresseurs [25].

2.5.3.2. Hémofiltration

L'hémofiltration correspond à une purification du sang. Le modèle par "cytokinèse", illustré dans la Figure 8, entraîne une augmentation du gradient de concentration des cytokines et chimiokines du plasma vers les tissus. La migration des leucocytes vers le tissu infecté est alors facilitée, augmentant ainsi la clairance bactérienne. Utilisée dans la phase précoce du sepsis, l'hémofiltration a pour but d'atténuer le relargage massif de médiateurs pro et anti-inflammatoires afin de restaurer l'homéostasie. L'hémofiltration permet d'éliminer de façon non spécifique un grand nombre de molécules de l'inflammation impliquées dans la réponse immunitaire des patients en CS. Dans des modèles animaux de pancréatite, l'hémofiltration a engendré une amélioration hémodynamique, une inversion de l'immunoparalysie induite par le sepsis, et une augmentation de la survie des souris. Des études chez l'homme ont également pu montrer les effets bénéfiques de l'hémofiltration [31].

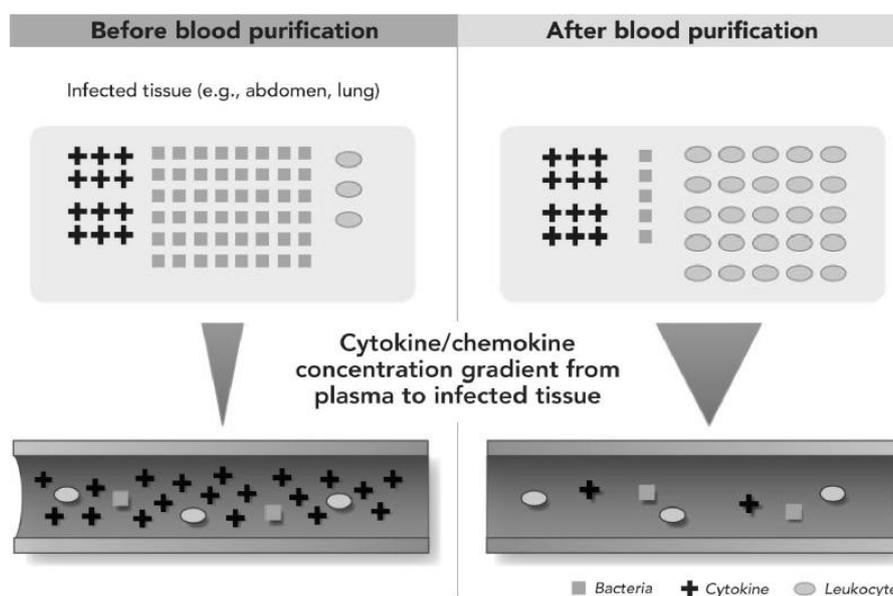


Figure 8 : Hémofiltration par "cytokinèse" [31]

Tapia *et al.* ont étudié les effets d'une hémofiltration de courte durée (6 heures) chez 31 patients en CS. Au total, 81 % des patients ont répondu au traitement, c'est à dire que les paramètres d'intérêt étaient améliorés au bout de quatre heures de traitement (*i.e.* diminution de la dose d'amines vasoactives et du remplissage, amélioration de la fonction respiratoire, baisse de la température, *etc.*). Cette étude a montré un effet bénéfique de l'hémofiltration de courte durée chez les patients en CS, cependant, elle mérite d'être confirmée dans d'autres études avec des effectifs plus importants, et contrôlée par un groupe témoin [32].

2.5.3.3. Protéine C activée

La protéine C activée (Xigris®), élément majeur dans l'inhibition de la cascade de coagulation, a été retirée du marché en 2011. Des essais cliniques supplémentaires n'ont pas montré d'intérêt de cette molécule dans le traitement du CS en terme d'amélioration de la survie des patients [33].

2.5.4. Traitements immunomodulateurs

Un grand nombre de molécules immunomodulatrices a été étudié dans des études cliniques et expérimentales. Cependant, la majorité de ces essais cliniques a montré relativement peu de succès, malgré des résultats d'études précliniques plutôt prometteurs. Une des principales limites à cette approche est qu'elle était basée sur des modèles expérimentaux inadaptés qui ne prenaient pas en compte la phase d'immunosuppression [21]. A titre d'exemples, nous détaillerons ici le cas des anti-TNF- α et des récepteurs antagonistes de l'IL-1 (IL1-RA) qui sont les molécules les plus étudiées. Nous parlerons également de l'Eritoran®, évalué plus récemment.

2.5.4.1. Anti-TNF- α

Le TNF- α joue un rôle central dans la physiopathologie septique. En effet, les concentrations en TNF- α sont augmentées lors d'un sepsis clinique ou expérimental. De plus, la persistance de concentrations élevées en TNF- α est associée à une mortalité des patients septiques plus importante. Enfin, la neutralisation du TNF- α dans des modèles expérimentaux entraîne généralement une amélioration des symptômes septiques ainsi qu'une augmentation de la survie. Jusqu'en 2001, onze essais cliniques utilisant les anti-TNF- α ont été conduits chez des patients atteints de sepsis. Les anti-TNF- α testés peuvent être classés en deux groupes, les anticorps monoclonaux anti-TNF- α humain et les récepteurs solubles du TNF- α aux propriétés neutralisantes [34].

Aucun de ces essais cliniques n'a pu montrer d'amélioration significative de la survie des patients, seulement pour certains une tendance vers une diminution de la mortalité grâce aux anti-TNF- α [34].

2.5.4.1. Récepteur antagoniste de l'interleukine 1

Deux essais cliniques multicentriques randomisés, contrôlés par placebo, en double aveugle ont étudié l'effet de l'administration d'IL1-RA sur la mortalité à vingt-huit jours de patients septiques. Respectivement, 696 [35] et 893 [36] patients ont été inclus dans chaque étude et ont reçu de façon aléatoire l'IL1-RA ou un placebo. Au total, aucune des études n'a permis de montrer une amélioration de la survie des patients septiques par administration d'IL1-RA.

2.5.4.2. Anti-TLR4 (Eritoran®)

L'Eritoran® est un antagoniste du LPS, qui l'empêche d'induire son signal intracellulaire habituel aboutissant à la translocation du NF- κ B au niveau du noyau. Notamment, l'Eritoran® bloque la production de cytokines *in vitro* et induit une diminution de la génération intracellulaire de cytokines pro-inflammatoires. Cliniquement, l'Eritoran® entraîne une diminution de la fièvre, de la fréquence cardiaque, et au niveau biologique est observée une diminution de la protéine C réactive, de la leucocytose, ainsi que des concentrations d'IL-6 et de TNF- α [37].

Deux essais cliniques randomisés, contrôlés par placebo, en double aveugle, ont étudié l'effet de l'administration d'Eritoran® sur la mortalité à vingt-huit jours de patients atteints de sepsis sévère. La première étude a inclus 300 patients répartis en trois groupes (placebo et deux doses croissantes d'Eritoran®). Aucune différence de mortalité n'a été observée entre les groupes, mais les auteurs ont mis en évidence une tendance à une diminution de la mortalité par l'Eritoran® chez les patients les plus sévères (définis par un score Apache (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) II supérieur à 28 (33,3 % de mortalité dans le groupe traité par Eritoran® contre 56,3 % dans le groupe placebo, $p = 0,105$) [38]. De la même manière, selon un communiqué de Matsuyama, l'essai clinique de phase III ayant inclus 2 000 patients n'a pas pu montrer d'amélioration de la survie après un traitement par l'Eritoran® [39].

2.6. CONCLUSION

Les syndromes septiques représentent la première cause de mortalité des patients hospitalisés en réanimation malgré les nombreux efforts réalisés ces vingt dernières années pour identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Il est donc nécessaire de trouver d'autres pistes thérapeutiques efficaces. Cette nouvelle approche est basée sur l'évolution des connaissances de la physiopathologie du CS et notamment par la prise en considération de la présence de dysfonctions immunitaires chez les patients.

3. EVOLUTION DES CONNAISSANCES DE LA PHYSIOPATHOLOGIE

La composante anti-inflammatoire de la réponse à l'infection se met en place en parallèle de la réponse pro-inflammatoire. Elle comprend des mécanismes de compensation négative qui permettent de contrebalancer la réponse initiale. Elle s'accompagne d'une reprogrammation leucocytaire et d'une hypo réactivité cellulaire. La composante anti-inflammatoire est importante chez la majorité des patients.

Les mécanismes de compensation sont présentés dans la suite de ce document, ainsi que leurs conséquences sur le système immunitaire et enfin, les perspectives thérapeutiques qui en découlent.

3.1. MECANISMES ANTI-INFLAMMATOIRES DE COMPENSATION

Les mécanismes anti-inflammatoires de compensation sont nombreux. Ils comprennent notamment le phénomène de tolérance à l'endotoxine, l'induction de l'apoptose, la régulation nerveuse et la régulation épigénétique.

3.1.1. Tolérance à l'endotoxine

Le phénomène de tolérance à l'endotoxine, mieux connu sous le terme d'Endotoxine Tolérance (ET), est un état d'immunosuppression pouvant survenir après de multiples pathologies et notamment, après un CS. L'ET se met en place lorsque les cellules de l'organisme, suite à une première exposition à de faibles concentrations d'endotoxine (LPS), entrent dans un état d'incapacité à répondre à une exposition ultérieure au LPS. Ce phénomène a été observé *in vitro* et *in vivo* aussi bien chez des humains que sur des modèles animaux [40, 41].

Les études, tant *in vivo* chez la souris que *in vitro* chez l'homme et la souris, ont montré que les monocytes/macrophages sont les principales cellules responsables de cet état d'ET. Leur production de TNF- α est fortement diminuée en comparaison de celle de monocytes exposés une seule fois au LPS. La majorité des gènes dont l'expression est réprimée par une double stimulation au LPS sont les gènes codant pour des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-1 β . D'autre part, il se produit une induction d'expression des gènes codant pour des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF- β et l' IL1-RA [40-42].

La fonctionnalité des monocytes est modifiée au cours du phénomène d'ET : leur capacité phagocytaire est augmentée alors que leur faculté de présentation antigénique est réduite. Par ailleurs, leur capacité de destruction des pathogènes phagocytés est conservée. L'altération de la

présentation antigénique est liée à une diminution d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (comme *Human Leucocyte Antigen* (HLA)-DR, par exemple) à la surface des monocytes. Ce phénomène empêche le développement d'une réponse immunitaire adaptative, par diminution de la prolifération lymphocytaire T et de la production d'IFN- γ . Il a été également mis en évidence une polarisation Th (T helper) 2 de la réponse adaptative [40, 41].

L'ET touche également d'autres lignées cellulaires comme les DC et les PN. Les DC ont une expression diminuée d'IL-12, de TNF- α et d'IL-6, et leur capacité à activer les L_T est altérée [42]. Les PN endotoxine-tolérants montrent une baisse d'expression du TLR 4 mais conservent leur phénotype cytokinique. Les cellules endothéliales de l'intestin présentent elles aussi un état d'ET lié à une diminution de leur activation et de leur capacité d'adhésion leucocytaire.

3.1.2. Induction des processus apoptotiques

Un des principaux mécanismes de la réponse anti-inflammatoire dans le sepsis est caractérisé par l'induction de l'apoptose des cellules de l'immunité innée et adaptative, associée à la composante immunosuppressive de ces cellules en apoptose sur les cellules immunitaires persistantes.

Des autopsies de patients septiques (réalisées 30 à 90 minutes suivant le décès afin d'éviter l'autolyse cellulaire) ont montré une apoptose extensive des Ly et des cellules épithéliales gastro-intestinales plus importante que chez des sujets non septiques [43, 44]. Ce phénomène a été également décrit chez la souris [45]. Des études phénotypiques ont révélé une baisse considérable des L_B, des L_TCD₄ et des DC interdigitales et folliculaires au niveau splénique chez ces patients. Il semblerait que le degré d'apoptose lymphocytaire soit corrélé avec la sévérité du sepsis. Ces études n'ont cependant pas mis en évidence de diminution du nombre de macrophages [43].

Deux mécanismes principaux par lesquels l'apoptose contribue à l'état d'immunoparalysie au cours du sepsis ont été décrits :

- La décroissance importante des L_T et des L_B ainsi que la diminution des DC, altèrent les réponses immunitaires adaptative et innée en raison des nombreuses interactions entre les deux systèmes.

- La destruction des corps apoptotiques par les macrophages induit la synthèse de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF- β tout en supprimant la production de cytokines pro-inflammatoires. Ceci entraîne un état de tolérance immune des cellules immunitaires survivantes. Elles sont caractérisées par une anergie et un shift Th2, se traduisant en dysfonctions immunitaires.

D'autre part, la destruction des corps apoptotiques ne permet pas l'expression des molécules de co-stimulation ce qui a pour conséquence, soit d'inhiber les L_T qui entrent en contact avec les CPA, soit d'induire leur apoptose [43].

3.1.3. Régulation nerveuse

Le système nerveux central régule la réponse immunitaire innée par différentes voies, nerveuses ou hormonales. En général, les systèmes nerveux sympathique et parasympathique et la réponse neuroendocrine au stress inhibent la réponse immunitaire innée au niveau systémique, tandis que le système nerveux périphérique entraîne une amplification de la réponse immunitaire localisée. Ces systèmes sont complémentaires et permettent au départ une activation et une amplification de la réponse inflammatoire localement pour éliminer les pathogènes au site de l'infection. Ensuite, un contrôle de l'inflammation par les systèmes nerveux sympathique et parasympathique entraîne une restauration de l'homéostasie de l'hôte [46]. Les connexions entre les systèmes nerveux et immunitaire sont représentées dans la Figure 9.

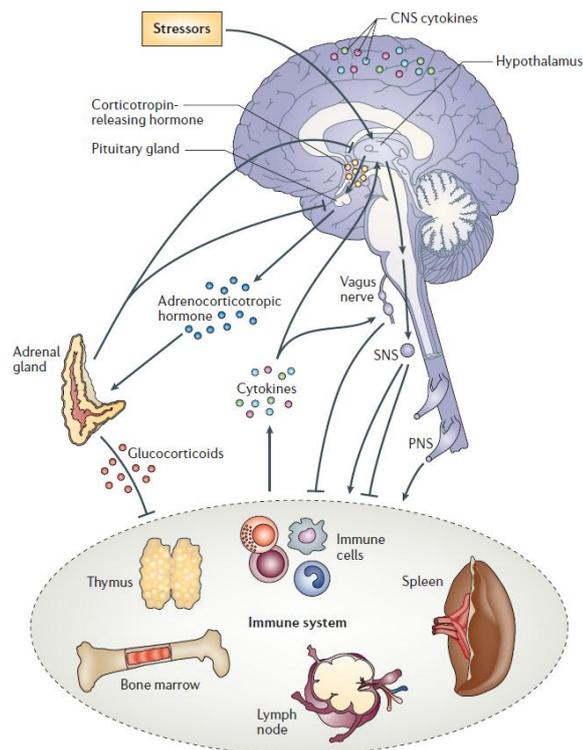


Figure 9 : Connexions entre les systèmes nerveux et immunitaire [46]

CNS = Système nerveux central, SNS = Système nerveux sympathique, PNS = Système nerveux périphérique

3.1.4. Régulation épigénétique

L'épigénétique est un terme général regroupant tous les mécanismes qui gouvernent l'expression des gènes sans modifier la séquence ADN (acide désoxyribonucléique) existante de

l'organisme. Les mécanismes épigénétiques comprennent des modifications chimiques de l'ADN et des histones, qui entraînent une modification de l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription.

Les mécanismes épigénétiques dans la physiopathologie du CS représentent une voie de recherche intéressante. En effet, l'épigénétique est très importante dans le développement du système immunitaire et de ses fonctions effectrices et il existe une corrélation entre la sévérité de la pathologie et la régulation épigénétique de gènes de l'inflammation. Celle-ci joue un rôle dans l'immunité innée et l'immunité adaptative. La régulation de l'immunité innée concerne les réponses aux cytokines et aux chimiokines tandis que la régulation de l'immunité adaptative touche principalement l'activation lymphocytaire et les fonctions effectrices [47].

Quelques exemples de polymorphismes génétiques retrouvés chez les patients atteints de sepsis ou d'infection à méningocoque sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Polymorphismes génétiques des patients atteints de sepsis ou d'infection à méningocoque d'après Cohen [48]

Facteur de l'hôte	Association génétique	Effet clinique
TNF- α	Allèle TNF2 Mutation G308A du promoteur du TNF	Augmentation de la concentration en TNF- α associée à la mortalité
TNF- β	Allèle TNFB2	Augmentation de la concentration en TNF- β associée à la survenue de sepsis chez les traumatisés
IL1-RA (Récepteur antagoniste de l'interleukine 1)	Allèle ILRN*2	Augmentation de la concentration en IL-1 β et de la sévérité du sepsis
Facteur V Leiden	FV ^L	Effet sur la sévérité d'infection à méningocoque
Activateur tissulaire du plasminogène	Polymorphisme insertion/délétion	Pas d'effet sur les infections à méningocoque
Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1)	Polymorphisme insertion/délétion 4G/5G	4G/4G associée à une augmentation de la concentration en PAI-1 et à une augmentation de la sévérité d'infection à méningocoque
CD32 (Fc γ RIIa)	Allotype R131	Moins bon pronostic des infections à méningocoque
CD14	Polymorphisme C(-159)T du promoteur	Augmentation de la susceptibilité au choc septique et à la mortalité
TLR4	Allèle Asp299Gly	Association significative avec choc septique, et en particulier sepsis à bactérie à Gram négatif

3.2. CONSEQUENCES SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

L'immunosuppression post septique touche les deux versants de l'immunité. L'immunité innée est caractérisée par une anergie monocytaire liée au phénomène d'ET et l'immunité adaptative est représentée par une diminution quantitative et qualitative de l'ensemble des lignées lymphocytaires.

L'ancrage de notre travail se situant sur le versant de l'immunité adaptative, cette partie sera majoritairement détaillée et nous passerons rapidement sur le versant de l'immunité innée.

3.2.1. Système immunitaire inné

3.2.1.1. Polynucléaires neutrophiles

Une infection est associée à une augmentation de l'hématopoïèse, c'est pourquoi on retrouve généralement chez les patients septiques une hyperleucocytose associée à une polynucléose et à une myélémie. Les fonctions des PN circulants des patients septiques ou en SRIS peuvent être aussi bien réduites que renforcées, ainsi que l'expression des différents récepteurs qui peut être réprimée ou augmentée. Chez les patients septiques, les capacités de phagocytose et de chimiotactisme des PN sont très souvent diminuées, résultant en une incapacité des PN à détruire les bactéries [49].

3.2.1.2. Monocytes

Les monocytes des patients septiques sont anergiques par diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF, l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-12. S'ajoute à cela une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 par exemple. Il s'agit du phénomène d'ET, décrit au paragraphe 3.1.1..

Une diminution de l'expression de HLA-DR monocytaire est observée chez les patients après un CS. L'altération des capacités de présentation antigénique qui en découle est corrélée à une prédisposition des patients aux IN [50].

Le niveau d'expression de HLA-DR monocytaire est un bon reflet de l'état d'immunosuppression général car il est régulé par différents médiateurs, notamment l'IFN- γ , l'IL-10, les corticoïdes et les catécholamines [42]. Cette expression peut être facilement mesurée par cytométrie en flux, elle est corrélée à l'immunosuppression des patients. En effet, il est clairement démontré que son expression reste faible chez les patients non-survivants ou chez ceux qui vont développer une IN (< 30 % versus > 90 % chez les sujets sains) [51, 52]. La mesure de l'expression de HLA-DR monocytaire est un bon

marqueur prédictif de la sévérité des patients et pourrait permettre leur stratification avant la mise en place d'un traitement immunostimulant [51].

3.2.2. Système immunitaire adaptatif

Les altérations lymphocytaires faisant suite à un CS sont nombreuses. Elles comprennent des altérations phénotypiques avec une augmentation de l'expression des co-récepteurs inhibiteurs associée à une diminution de l'expression des co-récepteurs activateurs. L'expression du CD₃ et des molécules du CMH sont elles-mêmes altérées. Les altérations fonctionnelles sont marquées par une altération de la prolifération lymphocytaire *ex vivo* associée à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et à un shift de la réponse immunitaire vers une réponse de type Th₂. Il existe également une induction des L_T régulateurs et une augmentation de l'apoptose conduisant à une lymphopénie importante.

Ces altérations lymphocytaires chez les patients en CS peuvent non seulement empêcher l'éradication du microbe initial, mais également rendre le patient plus vulnérable à de nouvelles IN souvent plus graves par la présence de germes multi résistants aux traitements anti-infectieux [16]. Les altérations lymphocytaires sont également responsables de réactivations virales (cytomégalovirus) retrouvées plus habituellement lors de traitements immunosuppresseurs. Ces réactivations virales sont associées à un mauvais pronostic chez les patients en CS, elles conduisent notamment à une augmentation de la durée d'hospitalisation et à une intubation prolongée [53]. Kalil *et al.* ont par ailleurs montré une influence de ces réactivations virales sur la mortalité des patients [54].

3.2.2.1. Apoptose

Les patients septiques connaissent une baisse significative du nombre de Ly *via* des processus apoptotiques. Certaines équipes ont montré une augmentation importante de l'apoptose lymphocytaire chez les patients septiques tant au niveau tissulaire que circulatoire. Toutes les sous-populations sont concernées, L_TCD₄ et L_TCD₈, L_B et L_{NK} [22, 45, 55]. Les cellules en apoptose ont elles-mêmes un effet immunosuppresseur sur les cellules de l'immunité [56].

Le degré d'apoptose, la durée et l'étendue de la lymphopénie sont corrélés avec la sévérité du CS et la survenue d'IN [42, 55].

L'apoptose peut survenir par deux voies de signalisation, la voie des récepteurs de mort cellulaire (incluant les récepteurs Fas, TRAIL, *etc.*) aboutissant à l'activation de la caspase 8 et la voie mitochondriale, par relargage de facteurs pro-apoptotiques entraînant l'activation de la caspase 9.

Les caspases 8 et 9 activent alors la caspase 3 qui appartient à la voie de signalisation finale commune de l'apoptose. En 2005, Hotchkiss *et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'apoptose lymphocytaire chez les patients en CS par rapport à des volontaires sains (VS) et des patients non septiques hospitalisés en réanimation. Elle concerne toutes les sous-populations lymphocytaires (L_TCD_4 , L_TCD_8 , L_B et L_{NK}) et est corrélée à l'activité du sepsis. Les patients atteints de CS ont une augmentation des caspases 3, 8 et 9, correspondant à une activation globale de l'ensemble des voies de signalisation de l'apoptose [56].

L'importante contribution de l'apoptose lymphocytaire dans les désordres immunitaires des patients en CS conduit à de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, le blocage de l'apoptose pourrait représenter une piste intéressante pour le traitement des patients. Plusieurs voies ont été évoquées comme la surexpression de B cell lymphoma 2 (Bcl-2), l'inhibition des caspases, *etc.* [43]

3.2.2.2. Altérations phénotypiques

Une liaison de forte affinité entre les molécules du CMH de classe II à la surface des CPA et le récepteur cellulaire T (TCR) au niveau lymphocytaire est indispensable pour une activation lymphocytaire optimale. Cette liaison de haute affinité est possible grâce aux co-récepteurs activateurs exprimés à la surface de ces cellules : l'interaction du CD28 lymphocytaire avec les molécules B7 (CD80 et CD86) monocytaires représente un signal majeur pour l'activation des L_T [52]. Cette interaction est représentée sur la Figure 10.

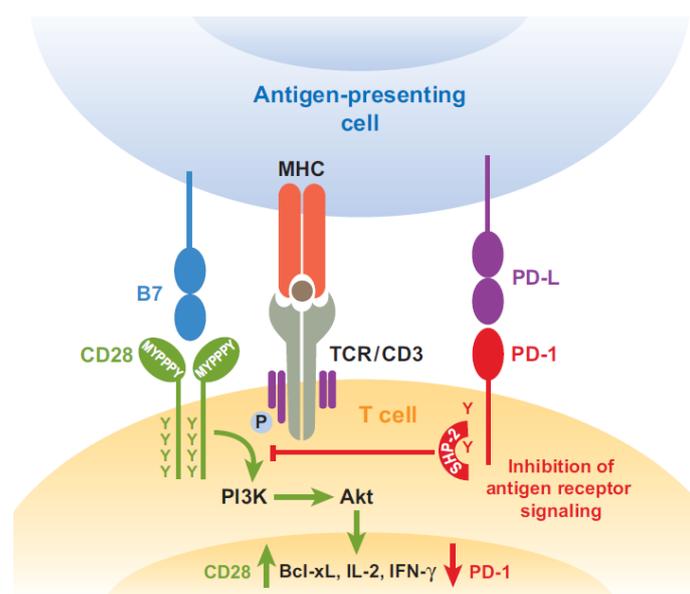


Figure 10 : Voie de stimulation du L_T via le TCR et ses principales voies co-stimulatrices ou co-inhibitrices [57]

PD = Programmed Death, TCR = récepteur cellulaire T, MHC = Complexe Majeur d'histocompatibilité, IL-2 = interleukine-2, IFN- γ = interféron gamma, Bcl = B cell lymphoma

L'étude de Manjuck *et al.* a montré que l'altération de la prolifération lymphocytaire chez les patients septiques n'était pas seulement associée à une diminution d'expression de HLA-DR monocytaire, mais aussi à une expression plus faible des co-récepteurs activateurs de la présentation antigénique (CD86 monocytaire ainsi que le CD28 lymphocytaire). Cette équipe a également mis en évidence une augmentation de l'expression d'un co-récepteur inhibiteur à la surface lymphocytaire (CTLA-4 ou cytotoxic T lymphocyte antigen-4) : CTLA-4 empêche la liaison de CD28 avec les molécules B7 et déclenche des signaux inhibiteurs bloquant la réponse antigénique. [52]

Par ailleurs, notre équipe a montré une augmentation de l'expression de PD-1 (Programmed Death-1) à la surface des $L_T CD_4$ et une expression augmentée de PD-1 et ses ligands au niveau monocytaire. D'autre part, cette augmentation d'expression du système PD-1 est inversement corrélée aux capacités prolifératives des patients atteints de CS. PD-1, comme CTLA-4, est un co-récepteur inhibiteur. La liaison de ce système, parallèlement à la liaison TCR - CMH, engendre des signaux inhibiteurs au niveau des L_T , ceci étant caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire, une incapacité des L_T à proliférer et une diminution de la synthèse d'IFN- γ et d'IL-2 [58].

Ces altérations phénotypiques ont été également retrouvées au niveau splénique. En effet, l'équipe de R. Hotchkiss a pu mettre en évidence une diminution de l'expression de CD28 associée à une augmentation de l'expression de PD-1 et de CTLA-4 sur les L_T issus de prélèvements de rate de patients décédés suite à un CS. Sur les CPA, les auteurs observent également une diminution d'expression de CD86 et une augmentation de l'expression du ligand de PD-1. [44] Cette même équipe a par ailleurs récemment retrouvé une augmentation de l'expression de PD-1 et de CTLA-4 sur les $L_T CD_4$ et les $L_T CD_8$ de patients décédés suite à un CS [22].

Enfin, notre équipe a observé une décroissance significative de l'expression du CD_3 sur les L_T de patients en CS. Cette diminution concerne aussi bien les $L_T \alpha\beta$ et $\gamma\delta$. Cette diminution de l'expression du CD_3 , associée à une faible expression de HLA-DR monocytaire, entraîne un défaut de présentation antigénique et d'activation lymphocytaire. L'expression du CD_3 était par ailleurs plus faible chez les patients non survivants [59].

3.2.2.3. Lymphocytes T régulateurs

Le pourcentage de L_T régulateurs ($CD_4^+ CD_{25}^{high} CD_{127}^-$) est plus élevé chez les patients en CS que chez les sujets sains [22, 60]. Il semblerait que ces cellules soient moins sensibles aux processus apoptotiques que les $L_T CD_4$ effecteurs. L'augmentation de cette population régulatrice est corrélée à une diminution des capacités lymphoprolifératives. Chez la souris, la diminution d'expression du facteur de transcription des L_T régulateurs Forkhead box P3 (FoxP3) est associée à une restauration

de la prolifération lymphocytaire. Cette interrelation montre que l'augmentation des L_T régulateurs contribue à l'anergie lymphocytaire des patients septiques [60].

Chez les patients décédés de CS, l'équipe de R. Hotchkiss retrouve également cette augmentation de L_T régulateurs au niveau splénique [44].

3.2.2.4. Anergie lymphocytaire

L'ensemble de ces phénomènes contribue à une anergie lymphocytaire, illustrée chez les patients par une perte de la réaction d'hypersensibilité retardée lors d'une stimulation par des antigènes cutanés (*e.g.* tuberculine). En effet, une altération de la prolifération lymphocytaire est observée chez les patients après un traumatisme important (chirurgie majeure, brûlures, polytraumatisme ou CS). Elle est caractérisée *in vitro* par une réponse proliférative diminuée à une stimulation antigénique et *in vivo*, par une altération de l'intradermoréaction à la tuberculine. Cette diminution de la prolifération lymphocytaire est associée à une production moindre de cytokines telles que l'IL-2 ou l'IFN- γ par les cellules mononucléées du sang périphérique [22, 42, 58, 61]. Le défaut de prolifération lymphocytaire et de sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ sont corrélés à une augmentation de la mortalité des patients septiques [22, 61].

Lors de la phase d'immunoparalysie, les L_T sont caractérisés par un shift vers une réponse immunitaire de type Th2 : les cellules mononucléées ont un niveau d'expression faible en cytokines de type Th1 (*i.e.* TNF- α , IFN- γ , et IL-2) mais élevé en cytokines de type Th2 (*i.e.* IL-4) [42].

3.2.2.5. Altération du répertoire T

En 2012, notre équipe a mis en évidence une nette altération de la diversité du répertoire T chez les patients en CS, très précocement après le début du choc, et qui persiste au moins pendant sept jours. Cependant, nous avons observé une diversification du répertoire T entre le début du choc et le suivi à sept jours. Dans cet article, l'altération du répertoire T est associée aux autres dysfonctions immunitaires habituellement retrouvées dans le CS (*e.g.* lymphopénie, expression diminuée de HLA-DR monocytaire). Elle est également corrélée à un risque accru de décès et de développement d'IN [62].

En effet, chez les patients en CS, une diminution de la diversité du répertoire T pourrait contribuer à une plus grande susceptibilité des patients aux IN et pourrait également jouer un rôle dans la réactivation d'infections virales par cytomégalovirus ou Virus Epstein-Barr [62].

3.3. CHRONOLOGIE DES REPONSES PRO ET ANTI-INFLAMMATOIRES

3.3.1. Représentation en deux phases

De façon schématique (cf. Figure 11), la réponse immunologique au cours du CS se déroule en deux phases. La phase précoce d'activation immunitaire majeure est responsable du SRIS, elle est suivie très rapidement de la phase d'immunosuppression, par des mécanismes compensatoires. Le décès du patient peut survenir lors de la phase précoce, généralement par défaillance multiviscérale. Chez plus de 70 % des patients, il survient plus tardivement, par non éradication du microbe initial, développement d'IN secondaire, ou réactivations virales [63].

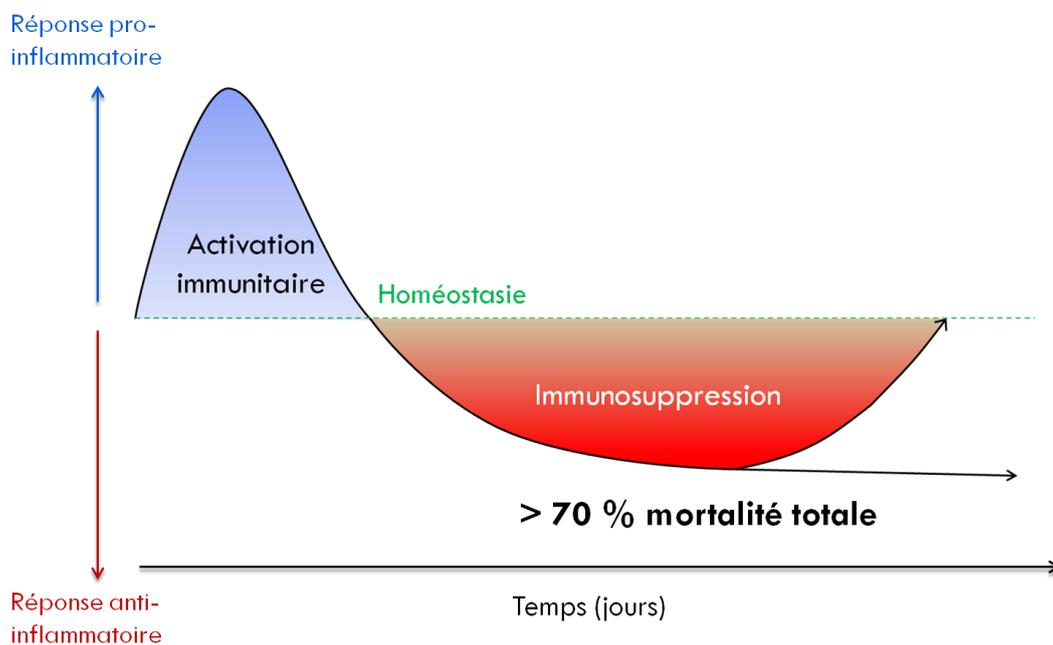


Figure 11 : Représentation de la réponse immunitaire au cours du sepsis [63]

3.3.2. Nouveaux modèles de souris septiques

Dans la majorité des modèles murins de CS, le décès de l'animal survient dans les trois premiers jours suivant le choc, c'est à dire, avant que la réponse immunitaire adaptative ne se mette en place. Ces modèles ne sont pas satisfaisants étant donné que la plupart des patients décède plus tardivement, avec généralement une altération de leur système immunitaire adaptatif. Muenzer *et al.* ont développé un modèle de CS chez la souris prenant en compte l'ensemble de la physiopathologie, permettant d'obtenir un meilleur reflet de la maladie. En effet, les souris survivantes après la phase pro-inflammatoire entrent ensuite dans un état d'immunoparalysie avec une susceptibilité particulière aux infections secondaires, parmi lesquelles, les pneumopathies nosocomiales [64].

Ce type de modèle consiste dans un premier temps à effectuer une ligature et ponction caecale (CLP) à la souris, ce qui entraîne un état de CS (équivalent d'une péritonite chez l'homme). Les souris sont ensuite réanimées, par administration de solutés de remplissage et d'antibiotiques. Trois jours après, les souris survivantes vont inhaler une suspension bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa* ou *Streptococcus pneumoniae*) qui engendre une pneumopathie secondaire. Muenzer *et al.* ont montré une mortalité plus importante des souris ayant subi à la fois la CLP et l'inhalation bactérienne par rapport à celles ayant subi uniquement la pneumopathie ou la CLP [64]. Ceci est bien en concordance avec la présence d'altérations de la réponse immunitaire des souris suite à la CLP.

Murphey *et al.* ont également travaillé sur ce type de modèles. Ils ont montré que les souris après CLP avaient une élimination bactérienne réduite, une production d'IFN- γ et d'IL-12 diminuées, une synthèse d'IL-10 augmentée, en comparaison aux souris atteintes de pneumopathies primaires sans CLP préalable [65].

Il existe également des modèles de souris septiques atteintes secondairement d'infection fongique, tel que celui utilisé par l'équipe de R. Hotchkiss [66]. Cette équipe, pour évaluer l'intérêt de l'IL-7 recombinante chez des souris en CS, ont administré aux souris une suspension de *Candida albicans* par voie intraveineuse quatre jours après la CLP et deux jours avant l'administration d'IL-7 [66].

Ces nouveaux modèles de souris septiques présentent plusieurs avantages par rapport aux modèles précédents. Tout d'abord, ils forment un meilleur reflet du CS observé chez les patients de réanimation. Ensuite, ils contribuent à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la phase tardive du CS. Enfin, ces modèles sont très utiles pour l'évaluation de nouvelles thérapeutiques visant à inverser l'état d'immunoparalysie survenant après la phase initiale pro-inflammatoire.

3.3.3. Perspectives thérapeutiques

Les thérapies immunostimulantes sont maintenant considérées dans les syndromes septiques comme potentiel traitement adjuvant et les premiers essais cliniques donnent des résultats prometteurs. Les cibles potentielles des thérapies immunostimulantes sont nombreuses chez les patients en CS. Elles comprennent entre autres, des molécules capables de bloquer l'apoptose, de bloquer les co-récepteurs inhibiteurs, de détruire les cytokines anti-inflammatoires, d'augmenter l'expression monocytaire de HLA-DR, et d'activer les cellules T anergiques [42, 67]. Ces cibles sont exposées dans le Tableau 5 et la Figure 12.

Tableau 5 : Molécules pouvant rétablir les fonctions immunitaires au cours du sepsis d'après Opal [15] et Monneret [42]

PD-1 : Programmed Death-1, BTLA : B-cell and T-lymphocyte attenuator, MDSC : monocyte-derived suppressor cells, CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte antigen, GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IFN : Interféron, TLR : Toll Like Receptor, HLA : human leukocyte antigen, FLT-3L : Fms-related tyrosine kinase-3 ligand, Sirt-1 : silent information regulator-1

Stratégie	Mécanisme d'action proposé
Inhibiteurs des L _T régulateurs	Bloquent l'action des L _T régulateurs et limiter la production de TGF-β et d'IL-10
Anticorps anti-IL-10	Bloquent la désactivation monocytaire induite par l'IL-10
Anticorps anti-PD-1 ou anti-BTLA	Bloquent les signaux inhibiteurs médiés par PD-1 ou BTLA
Inhibiteurs des MDSC	Bloquent l'activité des MDSC qui inhibent les réponses immunitaires innée et adaptative
Inhibiteurs de CTLA-4	Bloquent les fonctions de co-stimulation négative de CTLA-4 sur les L _T
GM-CSF, IFN-γ, agonistes TLR	Activation monocytaire (Augmentation de l'expression de HLA-DR monocytaire)
IL-7, IL-15, FLT-3L	Préservent les fonctions des L _T et des cellules dendritiques et limite l'apoptose lymphocytaire
Activateurs de Sirt-1	Améliorent les fonctions mitochondriales et réduisent l'apoptose
Inhibiteurs des caspases	Diminution de l'apoptose lymphocytaire

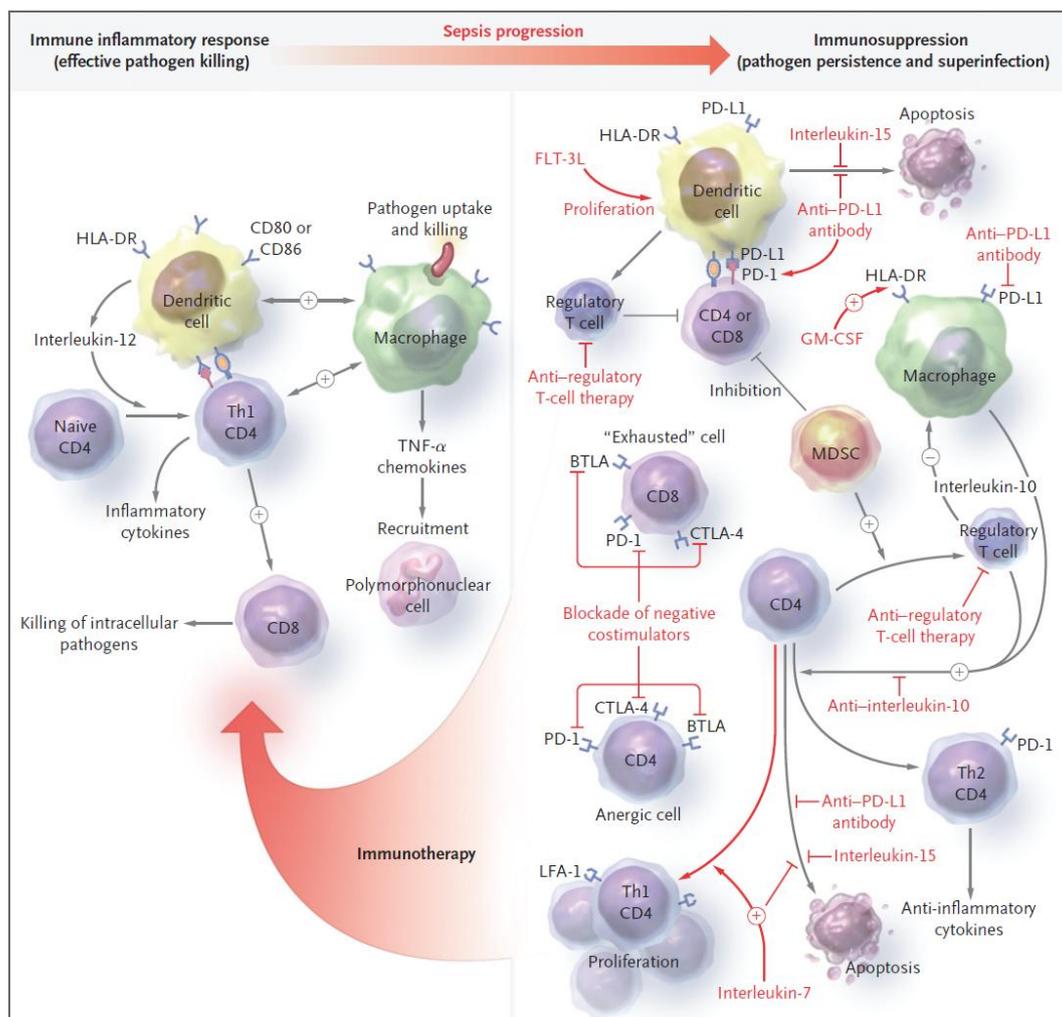


Figure 12 : Molécules capables de restaurer l'immunité post-septique [67].

FLT-3L : Fms-related tyrosine kinase-3 ligand, PD-L1 : Programmed-Death Ligand 1, GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1 et TNF-α : Tumor necrosis factor α

3.3.3.1. Interféron- γ et Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

L'IFN- γ est une molécule activatrice des monocytes par augmentation de leur capacité de présentation antigénique et induction de leur production de cytokines pro-inflammatoires. Dans une étude publiée en 1997, Döcke *et al.* ont montré *in vitro* la capacité de l'IFN- γ à augmenter la synthèse de TNF- α par les monocytes, mais aussi à restaurer l'expression monocyttaire de HLA-DR. Dans cette étude, l'IFN- γ a été administré à neuf patients atteints de sepsis et présentant une diminution d'expression monocyttaire de HLA-DR (< 30 % deux jours de suite). Cette molécule a été bien tolérée et a conduit à une augmentation de l'expression monocyttaire de HLA-DR chez tous les patients, ainsi qu'une restauration de leur capacité à produire du TNF- α après stimulation par le LPS [68].

Le GM-CSF est un facteur de croissance hématopoïétique qui accroît les défenses antimicrobiennes par augmentation de la survie, de la prolifération, de la différenciation et de la phagocytose des PN et des monocytes/macrophages. Il permet également la migration et l'adhésion des PN. Le GM-CSF a fait l'objet d'un essai clinique multicentrique, randomisé, en double aveugle et contrôlé par placebo chez 38 patients atteints de sepsis sévère ou de CS et présentant une immunosuppression [69]. Comme attendu, les investigateurs ont montré une augmentation des PN et des monocytes chez les patients traités par rapport au groupe contrôle. Ils ont également mis en évidence une augmentation des L_TCD₄ et L_TCD₈ chez les patients traités, mais pas d'augmentation des L_B et des L_{NK}. La production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes ainsi que l'expression monocyttaire de HLA-DR ont été restaurées chez les patients traités par GM-CSF. De plus, la durée de ventilation mécanique et la durée d'hospitalisation ont été plus courtes chez les patients traités par GM-CSF par rapport au groupe contrôle [69].

Un essai avec un plus grand nombre de patients est nécessaire pour évaluer l'impact d'un traitement par GM-CSF sur la survie des patients et la survenue d'IN. Néanmoins, ces premiers résultats sont très prometteurs à l'utilisation du GM-CSF en clinique.

3.3.3.2. Perspectives : IL-7, anti-PD-1, anti-CTLA-4

Concernant la restauration des fonctions lymphocytaires, les anticorps anti-PD-1 ont montré leur efficacité en cancérologie, en particulier chez les patients atteints de tumeurs PD-L1 positives [70]. Par ailleurs, l'équipe de Hotchkiss a montré une efficacité des anticorps anti-PD-1 sur un modèle murin de sepsis. Les auteurs ont notamment mis en évidence une prévention du déficit en Ly et en DC, un blocage de l'apoptose, et une amélioration de la survie des souris septiques par l'administration d'anticorps anti-PD1 [71]. Cette équipe a également montré une efficacité des

anticorps anti-CTLA-4 dans le sepsis, par diminution de l'apoptose et amélioration de la survie de souris septiques avec des faibles doses d'anticorps anti-CTLA-4 [72].

De par ses propriétés immunostimulantes, l'IL-7 semble elle aussi être une molécule très intéressante dans le sepsis. En effet, l'IL-7 s'est révélée efficace dans d'autres situations cliniques, notamment dans le SIDA, où les dysfonctions lymphocytaires sont comparables à celles observées chez les patients atteints de CS. Dans la partie suivante, nous détaillerons donc les propriétés de cette molécule afin de mieux comprendre l'intérêt de son utilisation chez les patients atteints de CS.

4. INTERLEUKINE-7

L'IL-7 est une cytokine non redondante, découverte en 1988 par Anthony E. Namen. Il a montré que la prolifération de précurseurs de cellules B *in vitro* nécessitait la présence de cellules stromales : en 1988, il met en évidence le facteur de croissance issu de ces cellules, appelé initialement lymphopoïétine-1, puis IL-7 [73].

Les valeurs normales d'IL-7 plasmatique chez l'adulte varient de 0,3 à 8,4 pg/mL [74-76].

Une augmentation de ces concentrations est observée dans toute situation pathologique retrouvant une lymphopénie (*e.g.* traitement immunosuppresseur, hémopathies, infection par le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH), *etc.*). Cette augmentation n'est pas liée à une plus grande production d'IL-7 mais à une diminution de son utilisation par les cellules [74].

Dans cette partie, nous évoquerons dans un premier temps les caractéristiques biochimiques de l'IL-7 (structure, production), puis nous étudierons son récepteur et ses voies de signalisation. Nous verrons enfin les fonctions biologiques de l'IL-7 et ses applications potentielles en thérapeutique.

4.1. STRUCTURE DE L'INTERLEUKINE-7

L'IL-7 appartient à une famille d'hématopoïétines regroupant les cytokines de classe 1 (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-9, IL-13, IL-15, *Monocyte-CSF* (M-CSF) et *Stem cell factor* (SCF)).

Le gène codant pour l'IL-7 est situé sur le bras long du chromosome 8 (8q12-q13), il comporte 6 exons et 9 introns, avec un cadre de lecture de 534 paires de bases, correspondant à 177 acides aminés (AA). La protéine IL-7 active est glycosylée et son poids moléculaire est de 25 kDa. Sa structure tridimensionnelle correspond à l'association de quatre hélices α avec deux boucles de liaison, elle est représentée sur la Figure 13 [77].

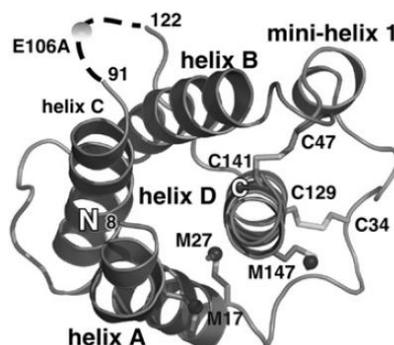


Figure 13 : Structure tridimensionnelle de l'interleukine-7 [77]

4.2. LIEUX DE PRODUCTION DE L'INTERLEUKINE-7

L'IL-7 est une cytokine tissulaire. Elle est synthétisée principalement par les cellules du stroma épithélial du thymus et de la moelle osseuse. D'autres cellules la produisent, mais de façon plus minoritaire : les kératinocytes, les hépatocytes fœtaux, les cellules dendritiques, les plaquettes et les cellules de la lignée mégacaryocytaire, les cellules endothéliales et les cellules de l'épithélium intestinal [78]. Les sites de production de l'IL-7 sont représentés sur la Figure 14.

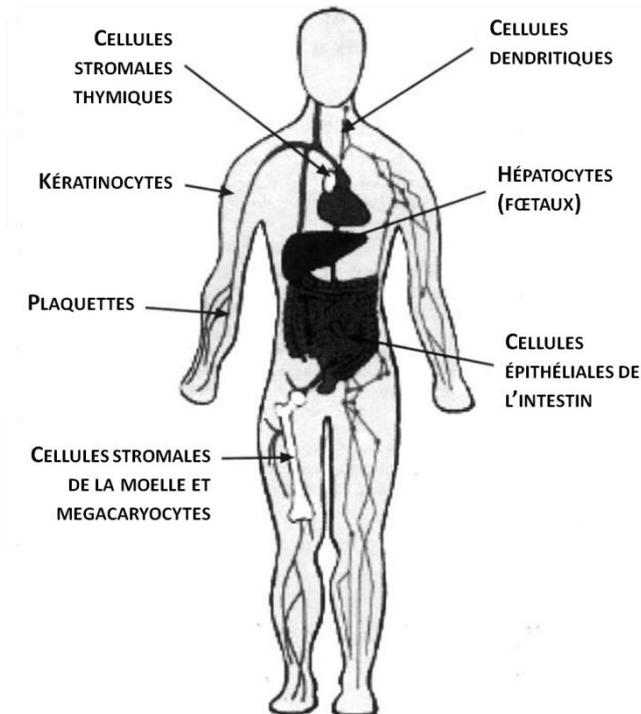


Figure 14 : Sites de production de l'interleukine-7 d'après Sasson [78]

4.3. RECEPTEUR DE L'INTERLEUKINE-7

4.3.1. Structure

Le récepteur de l'IL-7 est composé de deux protéines transmembranaires ayant chacune des domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire :

- la chaîne α ou IL-7R α ou CD₁₂₇.
- une chaîne commune à d'autres récepteurs de cytokines : γ_c ou CD₁₃₂.

4.3.1.1. Chaîne alpha

La chaîne α constitue la partie active du récepteur et porte le site de liaison de l'IL-7. Le couplage avec la chaîne γ est cependant nécessaire à l'activation du récepteur. Le gène codant pour la chaîne α est situé sur le bras court du chromosome 5 (5p13) [79]. La protéine est composée de 439 AA et son poids moléculaire est de 50 kDa. Elle comporte trois domaines, comme le montre la Figure 15 [80, 81] :

- un domaine extracellulaire (219 AA) composé de motifs tryptophane/sérine et de quatre résidus cystéine conservés
- un domaine transmembranaire (25 AA)
- un domaine intra cytoplasmique (195 AA) composé de résidus tyrosine : domaine tyrosine kinase

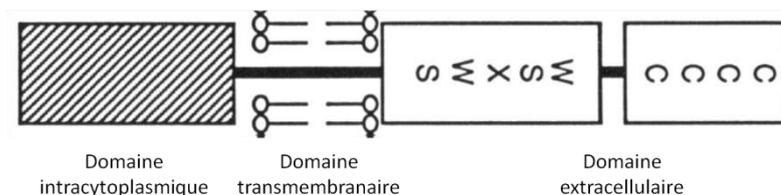


Figure 15 : Domaines de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-7 [80]

4.3.1.2. Chaîne γ

La chaîne γ est commune à toutes les cytokines de classe 1.

La structure de la chaîne γ est comparable à celle de la chaîne α concernant les régions définissant les trois domaines, extracellulaire, transmembranaire et intra cytoplasmique.

4.3.2. Expression

4.3.2.1. Expression cellulaire

La chaîne γ est exprimée par l'ensemble des cellules hématopoïétiques. L'IL-7R α est, quant à elle, exprimée essentiellement par les cellules de la lignée lymphoïde telles que les L_B immatures, les thymocytes et la majorité des L_T matures [82, 83]. On la retrouve également exprimée sur les progéniteurs de la moelle osseuse exprimant CD₃₄. Les différences d'expression du CD₁₂₇ selon le stade de maturation lymphocytaire sont regroupées dans la Figure 16.

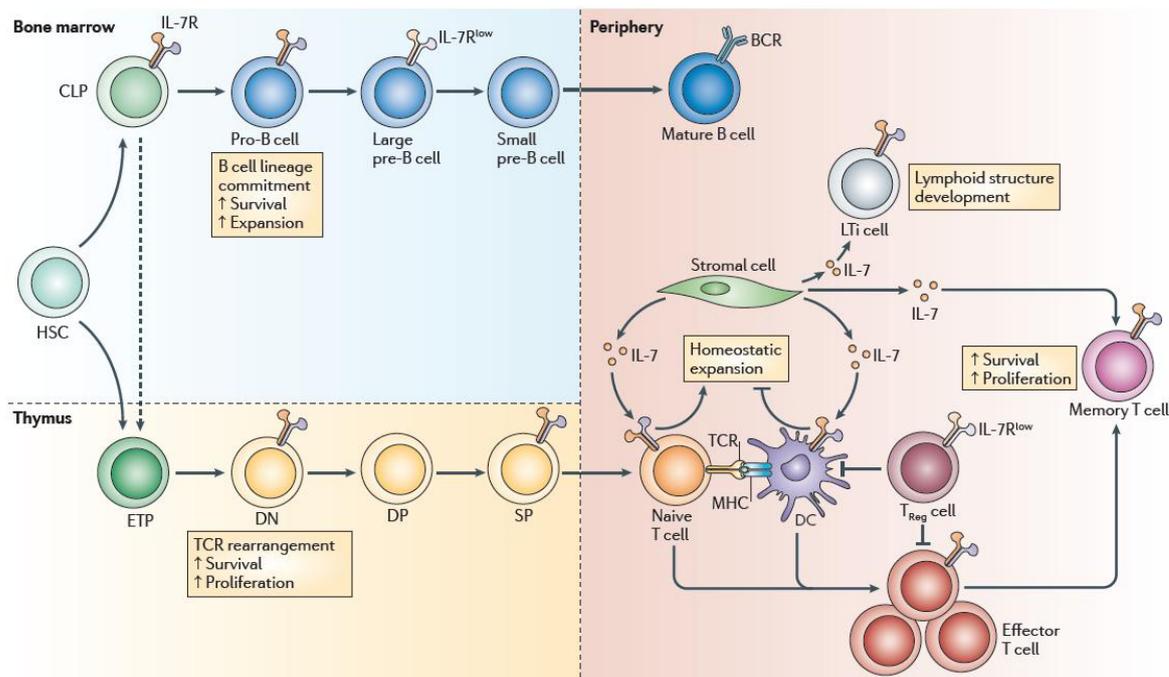


Figure 16 : Différences d'expression du CD₁₂₇ selon le stade de maturation lymphocytaire [84]

HSC : cellule souche hématopoïétique, CLP : progéniteur lymphoïde commun, IL-7R : chaîne alpha du récepteur de l'IL-7, BCR : récepteur cellulaire B, ETP : progéniteur lymphoïde T, DN : double négatif, DP : double positif, SP : simple positif, TCR : récepteur cellulaire T, MHC : complexe majeur d'histocompatibilité, DC : cellule dendritique, T_{reg} : L_T régulateur

L'absence d'expression de CD₁₂₇ a été observée sur les L_TCD₄ régulateurs (CD₄⁺ CD₂₅^{high}, FoxP₃⁺) [85], contrairement aux L_TCD₄ effecteurs. Cette caractéristique permet d'isoler ces deux types cellulaires par cytométrie en flux et facilite ainsi leur quantification au laboratoire.

Des formes de CD₁₂₇ soluble ont été rapportées chez des sujets sains et leucémiques : il s'agirait de variants tronqués d'épissage ayant perdu le domaine transmembranaire et une partie du domaine intracellulaire. La forme soluble de CD₁₂₇ garde cependant la capacité à lier l'IL-7 [78].

4.3.2.2. Régulation de l'expression cellulaire du CD₁₂₇

La régulation de l'expression du CD₁₂₇ se fait au niveau de la région promotrice de son gène (cf. Figure 17). Celle-ci comporte des motifs de liaison pour les facteurs de transcription Ikaros, PU.1 et RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*).

Le facteur de transcription se liant à PU.1 semble différer selon la lignée cellulaire T ou B. Pour le développement des L_B, la liaison de PU.1 couplé à un autre facteur (FLT₃ ou *FMS-related tyrosine kinase 3*) est nécessaire à l'expression du CD₁₂₇. PU.1 n'est cependant pas exprimé par les cellules de la lignée T, c'est en fait la liaison du facteur de transcription GABP (*GA-binding protein*) au site de PU.1 qui induit l'expression du CD₁₂₇ sur les thymocytes et les L_T périphériques [82].

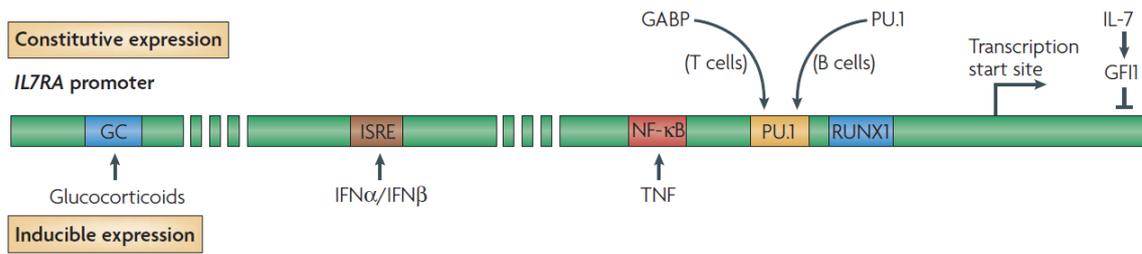


Figure 17 : Promoteur du gène de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-7 [82]

Différents stimuli sont capables d'induire une modification de l'expression du CD₁₂₇ en agissant au niveau de la région promotrice du gène, ils sont indiqués dans la Figure 18.

Regulator	Receptor*	Source	Function
<i>Inducers</i>			
FLT3 ligand	FLT3 (CD135)	Haematopoietic precursor cells, T cells, bone-marrow fibroblasts	Haematopoiesis
Glucocorticoids	Cytosolic glucocorticoid receptor	Adrenal glands	Immunosuppressant, anti-inflammatory effects
IFN α , IFN β	IFN α R2 (CD118) and IFN α R1	Leukocytes (IFN α), fibroblasts (IFN β)	Antiviral innate immune response, modulation of adaptive immunity
TNF	TNFR1 (TNFRSF1A, p55, CD120a) or TNFR2 (TNFRSF1B, p75, CD120b)	Macrophages, NK cells, T cells	Local inflammation, endothelial-cell activation
<i>Inhibitors</i>			
IL-7	IL-7R α (CD127) and γ_c (CD132)	Stromal cells in the thymus and lymphoid tissues	Growth and homeostasis of B cells and T cells in mice, growth and homeostasis of T cells in humans
IL-2 (through PI3K)	IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) and γ_c (CD132)	T cells	T-cell and B-cell proliferation, regulatory T-cell maturation
IL-4	IL-4R α (CD124) and γ_c (CD132)	T cells, mast cells, basophils	B-cell activation and regulation of IgE and IgG1 production, differentiation of naive T cells into T helper 2 cells
IL-6	IL-6R α (CD126) and IL-6R β (CD130)	Activated T cells, activated monocytes or macrophages, fibroblasts, endothelial cells	Growth and differentiation of B cells and T cells, regulation of the acute-phase response
IL-15	IL-15R α , IL-2R β (CD122) and γ_c (CD132)	Dendritic cells, macrophages	T-cell, B-cell and NK-cell activation
U50,488H	κ -opioid receptor	Synthetic non-peptide drug	Affective disorders, regulation of mood and behaviour

Figure 18 : Régulateurs de l'expression cellulaire du CD₁₂₇ [82]

4.3.3. Ligands de la chaîne α

Outre la chaîne γ_c , le CD₁₂₇ est capable de s'associer avec une autre protéine (γ_c -like), conduisant à la reconnaissance d'un ligand différent : il s'agit du TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*), reconnu par la sous unité TSLP-R (*TSLP-Receptor*). Les deux sous-unités du récepteur du TSLP sont coexprimées par les cellules dendritiques. Le TSLP a la capacité d'entraîner la prolifération de L_T naïfs par l'intermédiaire des cellules dendritiques [86].

C'est ainsi que le déficit en CD₁₂₇ est plus sévère que le déficit en IL-7 car elle peut alors être substituée par le TSLP pour induire une signalisation par la voie du CD₁₂₇. Lors d'un déficit en CD₁₂₇, ni l'IL-7 ni le TSLP n'aura d'action biologique.

4.4. VOIES DE SIGNALISATION INTERLEUKINE-7/CD₁₂₇

La liaison de l'IL-7 sur la chaîne α de son récepteur conduit à une hétérodimérisation α - γ c qui entraîne l'activation de Jak 3. Il s'agit d'une protéine de type tyrosine kinase, qui est associée de manière constitutive à la région C-terminale de la chaîne γ c. Jak 3 est fortement exprimée par les L_T et les L_B et, à un niveau plus faible, par les monocytes, les cellules endothéliales et les kératinocytes. Jak 3, une fois activé, entraîne la phosphorylation de Jak 1 et du CD₁₂₇.

Les deux voies de signalisation principales qui découlent de Jak 1 sont les voies STAT (*Signal transducers and activators of transcription*) et PI3K/AKT (protéine kinase B) qui agissent sur l'apoptose [81, 87].

4.4.1. Voie JAK-STAT

Lors de l'hétérodimérisation du récepteur, Jak 3 entraîne la phosphorylation de Jak 1 et du CD₁₂₇. Cette étape conduit à la création de sites de liaison pour les facteurs de transcription STAT 1, 2, 3 et 5 qui seront à leur tour phosphorylés par Jak 1 et Jak 3. La phosphorylation des facteurs STAT entraîne leur dimérisation, puis leur translocation vers le noyau de la cellule, aboutissant à l'activation de gènes spécifiques :

- STAT 1 a un effet anti-tumoral par répression de l'expression des oncogènes c-myc et c-jun.
- STAT 5 a une action anti-apoptotique par régulation de l'expression de Bcl-2 et des caspases.

4.4.2. Voie de la kinase PI3/AKT

La voie de signalisation par la kinase PI3 est minoritaire par rapport à la précédente. Elle permet la survie des cellules de la lignée T. On la retrouve également dans de nombreux autres types cellulaires, où elle régule diverses fonctions comme la progression du cycle cellulaire, la transcription protéique et le métabolisme [87].

Dans les thymocytes, la kinase PI3, suite à son activation par Jak 1, subit une translocation vers la membrane plasmique où elle phosphoryle le substrat lipidique PIP2 (phosphatidyl-inositol diphosphate). La conversion de PIP2 en phosphatidyl-inositol triphosphate (PIP3) permet le recrutement d'AKT au niveau membranaire où il est activé. AKT est une sérine/thréonine kinase ayant de multiples propriétés, notamment dans l'initiation du cycle cellulaire [87].

- AKT favorise la stabilité de c-myc et de la cycline D, protéines intervenant dans l'activation du cycle cellulaire, en inactivant GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase-3 β*), inhibiteur de ces deux protéines.

- AKT inactive les facteurs de transcription de la famille Forkhead, en inhibant la transcription de médiateurs de l'apoptose et de gènes intervenant dans l'inhibition du cycle cellulaire (p27kipl : membre de la famille des inhibiteurs du cycle cellulaire dépendants des cyclines, il inhibe la transition de la phase G₁ à la phase S)

- Outre sa fonction de régulation transcriptionnelle, AKT interagit de façon directe avec p27kipl, ce qui aboutit à sa phosphorylation et à sa dégradation [87].

Les voies de signalisation de l'IL-7 *via* le CD₁₂₇ sont résumées dans la Figure 19.

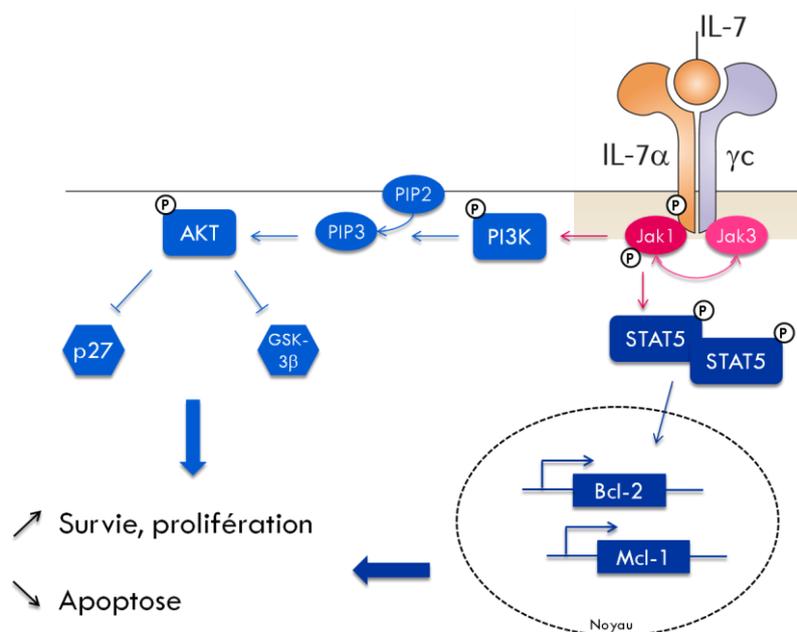


Figure 19 : Voies de signalisation de l'IL-7 *via* le CD₁₂₇ d'après [81]

IL-7 α : chaîne alpha du récepteur de l'IL-7, Jak : Janus kinase, PI3K : kinase PI3, PIP2 : phosphatidyl-inositol diphosphate, PIP3 : phosphatidyl-inositol triphosphate, AKT : protéine kinase B, GSK-3 β : *Glycogen Synthase Kinase-3 β* , STAT : *Signal transducers and activators of transcription*, Bcl-2 : *B cell lymphoma 2*, Mcl-1 : *Myeloid cell leukemia 1*

4.5. FONCTIONS BIOLOGIQUES DE L'INTERLEUKINE-7

L'IL-7 agit sur la survie, l'homéostasie, le développement et la prolifération des L_T et des L_B .

4.5.1. Action sur les lymphocytes T

L'IL-7 est indispensable au développement des L_T chez l'homme, comme l'indique l'absence complète de L_T retrouvée chez les patients atteints de Déficit Immunitaire Combiné Sévère (DICS) par mutation des gènes de l'IL-7R α ou de la chaîne γ_c [88].

L'IL-7 est une cytokine non redondante pour la maturation et la différenciation des L_T , elle est également indispensable à la survie des L_T au niveau des tissus lymphoïdes périphériques [89].

4.5.1.1. IL-7 et développement des L_T

L'ensemble des L_T matures provient de précurseurs T exprimant l'IL-7R α , suggérant que la capacité de réponse à l'IL-7 est un élément crucial à leur développement. L'IL-7 est nécessaire à la survie des thymocytes double négatif et à leur développement. Elle participe également à ce stade au réarrangement du TCR. L'expression du CD₁₂₇ est réprimée lors du dernier stade Ly double négatif pour disparaître totalement au stade des thymocytes double positif CD₄⁺CD₈⁺. L'absence de signalisation par l'IL-7, illustrée par l'absence d'expression de Bcl-2, prédispose ces cellules à l'apoptose. Des signaux de survie sont délivrés lors de la sélection positive *via* le TCR qui induit à nouveau l'expression du CD₁₂₇ sur les L_T simple positif [89].

La signalisation par l'IL-7 à ce stade induit la survie de ces cellules et participe à leur différenciation dans les différentes lignées T. L'absence d'IL-7 entraîne la différenciation des cellules en L_T CD₄ *helper* tandis que sa présence conduit à la différenciation en L_T CD₈ cytotoxiques. Les L_T deviennent ensuite matures et vont être exportés vers les tissus périphériques. Le besoin en IL-7 disparaît lors de l'activation des L_T ou la différenciation en L_T mémoire. A partir de ce stade, d'autres cytokines comme l'IL-2 ou l'IL-15 assurent la survie de ces cellules [89].

4.5.1.2. Homéostasie des L_T périphériques

L'IL-7 est impliquée dans la régulation de la prolifération des L_T CD₄ en réponse à une lymphopénie. L'IL-7 est disponible en permanence au niveau des organes lymphoïdes secondaires du fait de sa production continue par les cellules stromales. L'IL-7 induit donc de façon ininterrompue des signaux anti-apoptotiques et de co-stimulation, essentiels à la survie des L_T naïfs. Cependant, lorsque les L_T sont activés, l'expression du CD₁₂₇ est inhibée, ce qui protégerait ces cellules d'une

réponse incontrôlée à l'IL-7. Une exception toutefois a lieu lors de la réponse immunitaire primaire, où le CD₁₂₇ se trouve exprimé sélectivement sur une petite minorité de L_T effecteurs destinés à devenir des L_T mémoire. L'IL-7 a donc un rôle dans la transition des L_T effecteurs aux L_T mémoire [84].

Malgré une disponibilité permanente de l'IL-7 au niveau des organes lymphoïdes, une quantité suffisante d'IL-7 accessible est primordiale pour l'homéostasie des L_T.

Bien que le CD₁₂₇ soit exprimé par un large éventail de L_T matures, l'IL-7 agit de façon préférentielle sur certaines sous-populations, sans que ce phénomène soit encore bien compris. Par exemple, l'action de l'IL-7 est plus puissante sur les récents émigrants du thymus (RTEs), chez lesquels elle peut induire une prolifération même en l'absence de signalisation par le TCR. Ceci, en comparaison aux L_T naïfs qui ont un niveau d'expression de CD₁₂₇ similaire et chez qui l'action de l'IL-7 seule ne suffit pas à induire leur prolifération. De façon semblable, l'IL-7 a généralement un effet plus important sur les L_TCD₈ que sur les L_TCD₄ malgré des niveaux d'expression de CD₁₂₇ comparables [84].

4.5.1.3. Restauration du répertoire T

En augmentant préférentiellement l'expansion des RTEs et des L_T naïfs, comparativement aux L_T effecteurs, l'IL-7 entraîne une diversification du répertoire du TCR. Ceci serait lié à l'accroissement préférentiel des populations cellulaires T présentant une plus grande diversité au niveau du répertoire T (*cf.* Figure 20) [66, 90, 91].

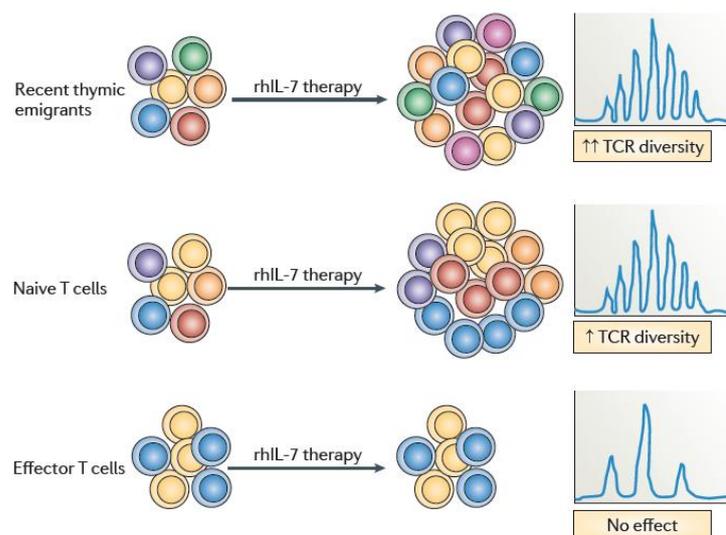


Figure 20 : Diversification du répertoire T sous l'effet de l'IL-7 [84]

4.5.2. Action sur les lymphocytes B

L'IL-7 joue un rôle majeur dans le développement des cellules de la lignée B chez la souris. En effet, les souris déficientes en IL-7 ou IL-7R α ne possèdent pas de cellules de la lignée B, à partir du stade pro-B [92, 93].

4.5.2.1. Rôle de l'IL-7 sur les précurseurs B

Si elle n'est pas indispensable au développement des L_B chez l'homme, l'IL-7 a sans doute un rôle important à jouer sur cette lignée cellulaire. En effet, l'expression cellulaire du CD₁₂₇ est fortement régulée tout au long du développement des L_B. Le CD₁₂₇ est exprimé sur les progéniteurs lymphoïdes communs jusqu'au stade Ly pré-B, à partir duquel les cellules B ne l'expriment plus. *In vitro*, les précurseurs B humains voient leur survie et leur prolifération augmenter en réponse à l'IL-7 [84].

Sur les précurseurs des L_B, l'IL-7 agit en synergie avec d'autres cofacteurs tels que l'IL-11, le SCF et FLT-3 : *in vitro*, le SCF associé à l'IL-7 conduit à l'accroissement du nombre de Ly pro-B en culture. Par ailleurs, l'ajout de FLT-3 et d'IL-7 à des progéniteurs hématopoïétiques entraîne une amélioration de la survie et de la prolifération des Ly pré-pro-B.

4.5.2.2. Survie et prolifération des L_B

Des études *in vitro* ont montré que l'IL-7 entraîne l'expansion clonale et la survie de L_B immatures. D'autre part, on peut observer une expansion des progéniteurs précoces des L_B chez des patients traités par de l'IL-7 recombinante [84].

L'action de l'IL-7 sur les L_B *via* la voie de signalisation du CD₁₂₇, entraîne la survie des cellules par régulation des facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl et Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1)) et pro-apoptotiques (Bax (*Bcl-2 associated X protein*), Bad (*Bcl-2 antagonist of cell death*) et Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*)). La survie des Ly pro-B est accrue suite à une augmentation du ratio Bcl-2 / Bax.

La prolifération cellulaire est quant à elle régulée par l'induction et l'inhibition de régulateurs positifs ou négatifs du cycle cellulaire. Une stimulation par l'IL-7 engendre par exemple une diminution d'expression de p27Kip, régulateur négatif du cycle cellulaire, ce qui engendre une augmentation de la prolifération. De façon similaire, l'IL-7 induit des activateurs du cycle cellulaire comme les protéines myc ou les cyclines D2 et D3 dont la fonction est d'entraîner la progression du cycle cellulaire *via* des kinases cycline-dépendantes [93].

Enfin, l'IL-7 contribue au réarrangement des gènes des immunoglobulines par répression de la transcription d'Igk lors du développement des Ly pro-B [84].

4.5.3. Interleukine-7 et apoptose

L'IL-7 est un facteur de survie pour différentes sous-populations de progéniteurs et de cellules lymphoïdes matures. En effet, son absence au niveau cellulaire déclenche le processus d'apoptose, mis en évidence par une augmentation de l'annexine V et une fragmentation d'ADN [81].

L'IL-7 protège les cellules de deux façons : d'une part en induisant la synthèse de facteurs anti-apoptotiques, et d'autre part, en inhibant l'apoptose de façon directe, par suppression de l'activité de protéines pro-apoptotiques [81].

4.5.3.1. Induction de facteurs anti-apoptotiques

L'IL-7 agit comme inducteur de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 : en plus de Bcl-2, elle active la protéine Bcl-xl, qui entraîne la survie des L_T par l'intermédiaire d'une libération d'IL-2. Mcl-1 est une autre protéine anti-apoptotique (*Bcl-2 like*) dont la synthèse est accrue par l'IL-7 au niveau thymique.

4.5.3.2. Suppression de protéines pro-apoptotiques

Les protéines pro-apoptotiques inhibées sous l'effet de l'IL-7 font également partie de la famille de Bcl-2 : il s'agit notamment des protéines Bax, Bad et Bim.

L'activation post-translationnelle de ces protéines induit leur translocation au niveau des membranes mitochondriales où elles vont provoquer des lésions et un relargage de cytochrome C qui va ensuite déclencher la cascade des caspases.

4.6. INTERLEUKINE-7 RECOMBINANTE HUMAINE

4.6.1. Essais en cours

La société Cythéris, société privée biopharmaceutique française, est axée sur la recherche et le développement de nouveaux traitements immuno-modulateurs, médicaments visant à renforcer ou reconstituer les défenses immunitaires de patients immunodéprimés.

Principal composé de la société, l'IL-7rh (CYT107) fait actuellement l'objet de dix-sept essais cliniques portant sur diverses pathologies retrouvant fréquemment une lymphopénie, parmi

lesquelles on retrouve principalement les infections virales (VIH : six études ; Virus de l'Hépatite C (VHC) : trois études ; Virus de l'Hépatite B : une étude) et les pathologies cancéreuses (six études).

Ces essais cliniques, référencés sur le site clinicaltrials.gov sont tous résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Essais cliniques utilisant l'interleukine-7 référencés sur le site clinicaltrials.gov

CYT107 et CYT 99 007 : IL-7rh, CT : Chimiothérapie, SC : Sous-cutané, LAM : Leucémie aiguë myéloïde, LMC : Leucémie myéloïde chronique, SMD : Syndrome myélodysplasique, ECG : Électrocardiogramme, RP : Radiographie pulmonaire, VIH : Virus de l'immunodéficience humaine, VHB : Virus de l'hépatite B, VHC : Virus de l'hépatite C, LCI : Lymphopénie CD₄ idiopathique.

Study Evaluating Impact of IL-7 on CD4 Lymphopenia, Risks of Severe Hematological Toxicity and Tumor Progression in Metastatic Breast Cancer Patients		Jun 2011 - Décembre 2012
Etude interventionnelle de phase IIa contrôlée par placebo, unicentrique, randomisée, en double aveugle		
Pathologie	Cancer du sein métastatique	
Objectif principal	Déterminer un schéma optimal d'administration de CYT107 pendant une chimiothérapie (CT), basé sur la restauration CD ₄ après 12 semaines de traitement	
Recrutement	Femmes > 18 ans Diagnostic histologique de cancer du sein métastatique HER2-neg Lymphopénie < 0,7 G/L	n = 24 patientes regroupées en 4 groupes
Design	- Placebo avant le 1 ^{er} cycle (J ₀ , J ₇ , J ₁₄) et pendant le 3 ^e cycle de CT (J ₆₃ , J ₇₀ , J ₇₇) - Induction par IL-7 avant le 1 ^{er} cycle (J ₀ , J ₇ , J ₁₄) et placebo pendant le 3 ^e cycle de CT (J ₆₃ , J ₇₀ , J ₇₇) - Induction par IL-7 avant le 1 ^{er} cycle (J ₀ , J ₇ , J ₁₄) et traitement différé par IL-7 pendant le 3 ^e cycle de CT (J ₆₃ , J ₇₀ , J ₇₇) - Induction par IL-7 avant le 1 ^{er} cycle (J ₀ , J ₇ , J ₁₄) et traitement d'entretien par IL-7 pendant le 3 ^e cycle de CT (J ₆₃ , J ₇₀ , J ₇₇)	L'IL-7 (CYT107) est administrée à 10 µg/kg/semaine, par voie SC
Suivi	Numération des CD ₄ à J ₀ , J ₂₁ , J ₆₃ et J ₈₄	

Interleukin-7 in Treating Patients With Metastatic Melanoma or Locally Advanced or Metastatic Kidney Cancer		Mai 2007 – Décembre 2010
Etude interventionnelle de phase I, non randomisée, ouverte		
Pathologie	Mélanome métastatique ou localement avancé, carcinome rénal métastatique	
Objectif principal	Déterminer l'innocuité du CYT107, la dose maximale tolérée et la dose biologiquement active de l'IL-7	
Recrutement	3 à 6 patients non lymphopéniques (L ₁ CD ₄ > 400/mm ³)	3 à 6 patients lymphopéniques (L ₁ CD ₄ < 400/mm ³)
Design	1 injection SC d'IL-7 par semaine pendant 3 semaines à doses croissantes afin de déterminer la dose active et la dose maximale tolérée	Idem avec une dose plus faible que la dose active déterminée par le 1 ^{er} groupe
Suivi	Etudes de pharmacocinétique et pharmacodynamie Numération CD ₃ /CD ₄ /CD ₈ /CD ₁₉ , mesure de l'expression de CD ₁₂₇ , Ki-67 et Bcl-2 sur les L ₁ CD ₄ et L ₁ CD ₈ , évaluation de la prolifération clonale des cellules B	
		Suivi 3 mois

Interleukin-7 and Vaccine Therapy in Treating Patients With Metastatic Melanoma		Août 2004 – Septembre 2005
Etude interventionnelle de phase I		
Pathologie	Mélanome métastatique	
Objectif principal	Etudier les effets secondaires et la meilleure dose d'IL-7 (CYT 99 007) donnée avec un antigène vaccinal pour le traitement de mélanome métastatique	
Recrutement	Patients > 18 ans atteints de mélanome métastatique confirmé histologiquement, Ly > 0,2 G/L	
Design	Injections SC d'IL-7 à J ₀ , J ₃ , J ₆ , J ₉ , J ₁₂ , J ₁₅ , J ₁₈ et J ₂₁ : doses croissantes d'IL-7 (→ dose maximale tolérée) en parallèle d'injections de peptides vaccinaux (Ag gp100 et MART-1) à J ₀ , J ₇ , J ₁₄ et J ₂₁	
Suivi	Visites à 1, 2 et 5 semaines, 3 et 6 mois, et à 1 an	

Interleukin-7 in Treating Patients With Refractory Solid Tumors		Avril 2003 – Septembre 2005
Etude interventionnelle de phase I		
Pathologie	Tumeurs solides réfractaires	
Objectif principal	Etudier les effets secondaires et la meilleure dose d'IL-7 (CYT 99 007) pour le traitement de tumeurs solides réfractaires	
Recrutement	Patients > 18 ans atteints de tumeurs solides réfractaires, L ₁ CD ₃ > 300/mm ³	
Design	Injections SC d'IL-7 à J ₀ , J ₂ , J ₄ , J ₆ , J ₈ , J ₁₀ , J ₁₂ et J ₁₄ : doses croissantes d'IL-7 (→ dose maximale tolérée)	
Suivi	Visites à 1, 3, 6 mois et 1 an	

Safety Study of IL-7 in Recipients of a Hemopoietic Stem Cell Transplant Peripheral Blood Stem Cell Transplant		Mars 2008 – Octobre 2009
Etude interventionnelle de phase I, non randomisée, ouverte		
Pathologie	Grefe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou Grefe de moelle osseuse (MO) HLA-identique chez des patients atteints de LAM, LMC et SMD	
Objectif principal	Déterminer l'innocuité et la dose recommandée de CYT107 administrée chez les patients receveurs de greffes de CSH ou de MO après prise de greffe et reconstitution hématopoïétique	
Recrutement	Patients > 15 ans, hémopathie non lymphoïde, receveurs de MO ou de CSH Rémission complète lors de l'administration d'IL-7 Lymphopénie persistante 6 mois post-greffe (L ₁ CD ₄ < 100/mm ³)	
Design	Traitement par CYT107 60 à 210 j post-greffe, 3 cohortes de 3 patients (doses croissantes d'IL-7 : 10, 20 puis 30 µg/kg/semaine) Schéma = 1 administration par semaine pendant 3 semaines (voie SC)	
Suivi	Clinique : visites à J ₀ , J ₁ , J ₇ , J ₁₄ , J ₂₁ , J ₂₈ , J ₄₂ , J ₅₆ et J ₇₇ : évaluation de la toxicité selon les NCI Common Toxicity Criteria	

Improving the Immune System With Human IL-7 Vaccine in Older Subjects Who Have Had Chemotherapy		Avril 2011 – Avril 2015
Etude interventionnelle de phase II, multicentrique, ouverte		
Contexte	Vaccination post-CT de sujets de plus de 60 ans	
Objectif principal	Evaluer l'effet de l'IL-7 sur la réponse vaccinale de personnes âgées dont le système immunitaire est soit non altéré (groupe contrôle), soit affaibli suite à une CT	
Recrutement	Homme ou femme > 60 ans Diagnostic positif cancer (colon, sein, vessie) non métastatique CT effectuée 4 semaines à 6 mois avant l'entrée dans l'étude	Homme ou femme > 60 ans N'ayant jamais reçu de CT anti-cancéreuse
Design	- 7 vaccins différents répartis en deux groupes (groupe 1 et groupe 2), administrés à des temps différents → 3 injections hebdomadaires d'IL-7, 4 semaines après le groupe 1 → groupe 2 administré 2 jours après la dernière injection d'IL-7	- Administration de 7 vaccins différents (Diphtérie, Tétanos, Poliomyélite, Pneumocoque, Hépatite A, Hépatite B, Grippe, et PhiX174 (contrôle))
Suivi	Réponse vaccinale (8 semaines à 1 an après administration), qualité de la réponse immunitaire (8 semaines), innocuité du produit (glyco-rh-IL-7)	

Inspire: Safety Study of IL-7 in HIV-infected Patients		Mai 2007 – Juillet 2010
Etude interventionnelle de phase I/IIa, contrôlée par placebo, multicentrique, randomisée, en simple aveugle		
Pathologie	VIH	
Objectif principal	Evaluer l'innocuité de l'IL-7 chez les patients infectés par le VIH	
Recrutement	Patients > 18 ans infectés par le VIH sous traitement antirétroviral actif depuis au moins 1 an L ₁ CD ₄ entre 101 et 400/mm ³ , charge virale < 50 copies/mL	
Design	3 injections SC d'IL-7 (1/semaine 3 semaines consécutives), 3 groupes de 10 patients : doses croissantes d'IL-7 (10, 20 puis 30 µg/kg/semaine)	
Suivi	Clinique : visites à J ₀ , J ₁ , J ₄ , J ₇ , J ₁₄ , J ₂₁ , J ₂₈ , J ₃₅ , J ₅₆ et J ₇₇ + tous les 3 mois pendant 1 an Bilans sanguins réguliers pendant les 96 premières heures après administration, analyses d'urines	ECG à J ₀ , J ₁ , J ₇ , J ₁₄ , J ₂₁ Radiographie pulmonaire (RP) à J ₂₁

Inspire 2: Study on IL-7 in HIV Patients		Janvier 2010 – Juin 2011
Etude interventionnelle de phase II, ouverte, multicentrique		
Pathologie	VIH	
Objectif principal	Evaluer l'activité biologique et la pharmacocinétique de l'IL-7 (CYT107, 20 µg/kg/semaine)	
Recrutement	Patients > 18 ans infectés par le VIH sous traitement antirétroviral actif depuis au moins 1 an L ₁ CD ₄ entre 101 et 400/mm ³ , charge virale < 50 copies/mL	
Design	3 injections SC d'IL-7 (20 µg/kg/semaine, 3 semaines consécutives) en plus de la trithérapie habituelle	
Suivi	Visites cliniques avec ECG, RP, échographie abdominale, tests sanguins et urinaires Evaluation [IL-7] plasmatique (pg/mL) à H ₁₂ , H ₂₄ , H ₄₈ et H ₉₆	

Inspire 3: Randomized Study on Multiple Cycles of Interleukin-7 in HIV Patients Immune Non-responders		Septembre 2010 – Juillet 2012
Etude interventionnelle de phase II, multicentrique, contrôlée, randomisée, ouverte		
Pathologie	VIH	
Objectif principal	Evaluer l'activité biologique et l'innocuité de cycles répétés d'IL-7 (CYT107), 20 µg/kg/semaine pendant 2 semaines, avec au maximum 4 cycles/21 mois ou 3 cycles/12 mois	
Recrutement	Patients > 18 ans infectés par le VIH-1 sous traitement antirétroviral actif depuis au moins 2 ans L ₁ CD ₄ entre 101 et 350/mm ³ , charge virale < 50 copies/mL n = 80 patients	
Design	Cycles de 3 injections SC d'IL-7 (20 µg/kg/semaine, 2 semaines consécutives) : maximum de 4 cycles/21 mois ou 3 cycles/12 mois en plus de la trithérapie habituelle	
Suivi	Visites cliniques avec ECG, RP, échographie abdominale, tests sanguins	
Safety of Interleukin-7 in HIV Infected People Currently Taking Anti-HIV Drugs		2004 - Avril 2007
Etude interventionnelle de phase I, contrôlée par placebo, randomisée, en double aveugle		
Pathologie	VIH	
Objectif principal	Evaluer l'innocuité d'une unique dose d'IL-7 chez des patients infectés par le VIH-1, sous antirétroviraux	
Recrutement	Patients > 18 ans infectés par le VIH sous traitement antirétroviral 2 bras fonction de la charge virale < ou > 50 copies/mL n = 36 patients	
Design	1 injection SC d'IL-7 ou placebo : doses croissantes d'IL-7 (→ 30 µg/kg/semaine)	
Suivi	Clinique : 9 visites pendant 13 semaines ECG à J ₀ , J ₁ Bilans sanguins à chaque visite, analyses d'urines Echographie splénique à J ₂₁	
Interleukin-7 to Treat HIV-Infected People Receiving Antiretroviral Treatment		Mars 2005 – Mai 2006
Etude interventionnelle de phase I, contrôlée par placebo, randomisée, en double aveugle		
Pathologie	VIH	
Objectif principal	Evaluer l'innocuité d'une unique dose d'IL-7 chez des patients infectés par le VIH-1, sous antirétroviraux	
Recrutement	Patients > 18 ans infectés par le VIH sous traitement antirétroviral, L ₁ CD ₄ > 100/mm ³ , charge virale < 50 000 copies/mL n = 40-80 patients	
Design	1 injection SC d'IL-7 ou placebo : doses croissantes d'IL-7 (3, 10, 30, 60 ou 100 µg/kg/semaine)	
Suivi	Clinique : 9 visites pendant 8 semaines : ECG à J ₀ , J ₁ , tests urinaires et sanguins (charge virale, L ₁ CD ₄ ...), échographie splénique et RP à J ₀ Niveau plasmatique d'IL-7 évalué à H ₀ , H _{0.5} , H ₁ , H _{1.5} , H ₂ , H _{2.5} , H ₄ , H ₈ et H ₁₂ après injection	
ERAMUNE 1: Therapeutic Intensification Plus Immunomodulation in HIV-infected Patients		Septembre 2010 - Août 2012
Etude interventionnelle de phase II, randomisée, multicentrique, non contrôlée par placebo		
Pathologie	VIH	
Hypothèse	L'éradication virale des patients infectés par le VIH est possible par une thérapie antirétrovirale intensive associée à une immunomodulation	
Recrutement	Patients > 18 ans infectés par le VIH-1 sous traitement antirétroviral depuis au moins 3 ans L ₁ CD ₄ > 350/mm ³ , charge virale < 500 copies/mL n = 28 patients	
Design	- Intensification antirétrovirale seule : ajout de raltegravir et maraviroc pendant 56 semaines - Intensification antirétrovirale associée à une immunothérapie : 1 cycle de 3 injections SC de CYT107 : 20 µg/kg/semaine	
Suivi (sem. 56)	Décroissance de l'ADN proviral dans les cellules mononucléées du sang périphérique, au niveau des tissus, des L ₁ CD ₄ Mesure de la charge virale, pourcentage de patients ayant une charge virale indétectable Numération des L ₁ CD ₄ , mesure de l'expression de marqueurs d'activation et de différenciation sur les L ₁ CD ₄ et les L ₁ CD ₈	
CONVERT: Dose Escalation of IL-7 Added on Antiviral Treatment and Vaccination in HBe Ag-negative Chronic Hepatitis B Virus (HBV) Infected Patients		Décembre 2009 – Avril 2011
Etude interventionnelle de phase I/II, contrôlée, randomisée, ouverte		
Pathologie	VHB	
Objectif principal	Evaluer l'activité biologique et l'innocuité à plus ou moins long terme de l'IL-7 (CYT107) combinée à un traitement antiviral chez des patients atteints d'hépatite B chronique	
Recrutement	Patients > 18 ans, hépatite B chronique, Ag HBe négatif, charge virale < 70 copies/mL depuis au moins 3 mois sous antiviral n = 24 patients (3 groupes)	
Design	3 patients : trithérapie (CYT107 + GenHevac + entecavir ou tenofovir) 3 patients : bithérapie (CYT107 + entecavir ou tenofovir) IL-7 : 4 injections SC hebdomadaires 1 patient contrôle (antiviral seul : entecavir ou tenofovir) 1 patient contrôle (antiviral seul : entecavir ou tenofovir) (3 doses selon groupe)	
Suivi	Hospitalisation d'1 nuit et 12 visites cliniques sur une durée de 55 semaines avec ECG, RP, échographie abdominale, tests sanguins et urinaires	
ECLIPSE 1: Dose Escalation Study of IL-7 and Bi-therapy in HCV Patients Resistant After 12 Weeks of Bi-therapy		Janvier 2009 – Juin 2011
Etude interventionnelle de phase I/IIa, ouverte, multicentrique		
Pathologie	VHC	
Objectif principal	Evaluer l'innocuité de l'IL-7 (CYT107) combinée à une bithérapie standard chez des patients présentant une hépatite C chronique de génotype 1 résistante à 12 semaines de bithérapie	
Recrutement	Patients > 18 ans infectés par VHC de génotype 1, chronique, résistant à la bithérapie standard n = 15 patients	
Design	Bithérapie (interféron-α pégylé/ribavirine) associée à 4 injections SC d'IL-7 (1/semaine, 4 doses : 3, 10, 20 et 30 µg/kg/semaine) La bithérapie est maintenue 4 semaines après la dernière injection d'IL-7.	
Suivi	Hospitalisation d'1 nuit et 8 visites cliniques avec ECG, RP, échographie abdominale, tests sanguins et urinaires	
ECLIPSE 2: Dose Escalation Study of Interleukin-7 (IL-7) and Bithérapie in HCV Genotype 1 or 4 Patients Resistant to Bithérapie Alone		Juillet 2008 – Juin 2011
Etude interventionnelle de phase I/IIa, ouverte, multicentrique		
Pathologie	VHC	
Objectif principal	Evaluer l'innocuité de l'IL-7 (CYT107) combinée à une bithérapie standard chez des patients infectés par VHC de génotype 1 ou 4, chronique, résistant à la bithérapie	
Recrutement	Patients > 18 ans infectés par VHC de génotype 1 ou 4, chronique, résistant à la bithérapie standard n = 18 patients	
Design	Bithérapie (interféron-α pégylé/ribavirine) pendant 6 à 10 semaines puis ajout de 4 injections SC d'IL-7 (1/semaine, 3 doses : 3, 10 et 20 µg/kg/semaine) La bithérapie est maintenue 9 semaines après la dernière injection d'IL-7.	
Suivi	Hospitalisation d'1 nuit et 15 visites cliniques sur une durée de 60 semaines avec ECG, RP, échographie abdominale, tests sanguins et urinaires	
ECLIPSE 3: Dose Escalation Study of Interleukin-7 (IL-7) and Bithérapie in Asiatic HCV Patients Resistant to Bithérapie		Janvier 2009 – Juin 2011
Etude interventionnelle de phase I/IIa, ouverte		
Pathologie	VHC	
Objectif principal	Evaluer l'innocuité de l'IL-7 (CYT107) combinée à une bithérapie standard chez des patients asiatiques infectés par VHC de génotype 1, chronique, résistant à la bithérapie	
Recrutement	Patients > 18 ans infectés par VHC de génotype 1, chronique, résistant à la bithérapie standard n = 15 patients	
Design	Bithérapie (interféron-α pégylé/ribavirine) pendant 6 à 10 semaines puis ajout de 4 injections SC d'IL-7 (1/semaine, 3 doses : 3, 10 et 20 µg/kg/semaine) La bithérapie est maintenue 9 semaines après la dernière injection d'IL-7.	
Suivi	Hospitalisation d'1 nuit et 15 visites cliniques sur une durée de 60 semaines avec ECG, RP, échographie abdominale, tests sanguins et urinaires	
ICICLE: Interleukin-7 (CYT107) Treatment of Idiopathic CD4 Lymphocytopenia: Expansion of CD4 T Cells		Février 2009 – Décembre 2013
Etude interventionnelle de phase I/IIa, ouverte, non randomisée		
Pathologie	Lymphopénie CD₄ idiopathique (LCI)	
Objectif principal	Evaluer l'innocuité de l'IL-7 (CYT107) chez les patients atteints de LCI Déterminer si l'IL-7 peut augmenter le nombre et les fonctions des cellules T chez les patients atteints de LCI	
Recrutement	Patients > 18 ans atteints de LCI (L ₁ CD ₄ < 300/mm ³ ou < 20 % Ly) n = 40 patients	
Design	2 cycles de 3 injections SC hebdomadaires d'IL-7 (doses croissantes : 3, 10 et 20 µg/kg) : semaine 1 et semaine 24	
Suivi	13 visites de contrôle sur une durée d'1 an avec analyses sanguines (notamment numération L ₁ CD ₄ ...), urinaires, RP, ECG, échographie splénique...	

4.6.2. Premiers résultats

Quatre essais cliniques de phase I ont administré des doses croissantes d'IL-7rh (10 à 60 µg/kg) à des patients infectés par le VIH ou atteints de cancer réfractaire. Le produit a été très bien toléré, n'induisant que des effets secondaires mineurs par rapport à une administration d'IL-2. L'administration de doses répétées d'IL-7rh conduit à des concentrations plasmatiques élevées, entraînant une diminution d'expression de l'IL-7R α . Ceci permet de limiter les effets de l'IL-7rh et procure donc une certaine sécurité vis-à-vis d'un surdosage [74].

4.6.2.1. Effet lymphopoïétique et diversification du répertoire T

Dans toutes les études, l'IL-7rh a induit une augmentation dose-dépendante des sous-populations de L_T circulants, avec une augmentation préférentielle des RTEs, des L_T naïfs et des L_T mémoire centraux. L'augmentation de ces sous-populations a contribué à une diversification du répertoire chez les patients. Certaines sous-populations lymphocytaires ne sont pas ou peu augmentées par l'administration d'IL-7rh. Il s'agit notamment des L_T régulateurs, des L_T mémoire effecteurs, et des populations sénescentes, dont le pourcentage dans la circulation est alors diminué. L'accroissement de la diversité du répertoire T a été observé chez les patients infectés par le VIH ou le VHC ainsi que chez les patients recevant une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Cf. Figure 21) [74, 91, 94, 95].

L'IL-7rh a également induit un agrandissement des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions), témoignant de l'augmentation de la production des cellules immunitaires. Cette expansion pourrait être liée à deux phénomènes, l'augmentation de la prolifération et la diminution de l'apoptose. Celle-ci a été mise en évidence notamment par une augmentation de l'expression du marqueur Bcl-2 [95].

Chez les patients infectés par le VIH et non répondeurs à une trithérapie classique, un cycle de 3 administrations d'IL-7 est suffisant pour augmenter la numération des L_TCD₄ au-delà de 500/µL. Cette administration d'IL-7 permet également de maintenir cette numération pendant au moins un an après le traitement [91, 94].

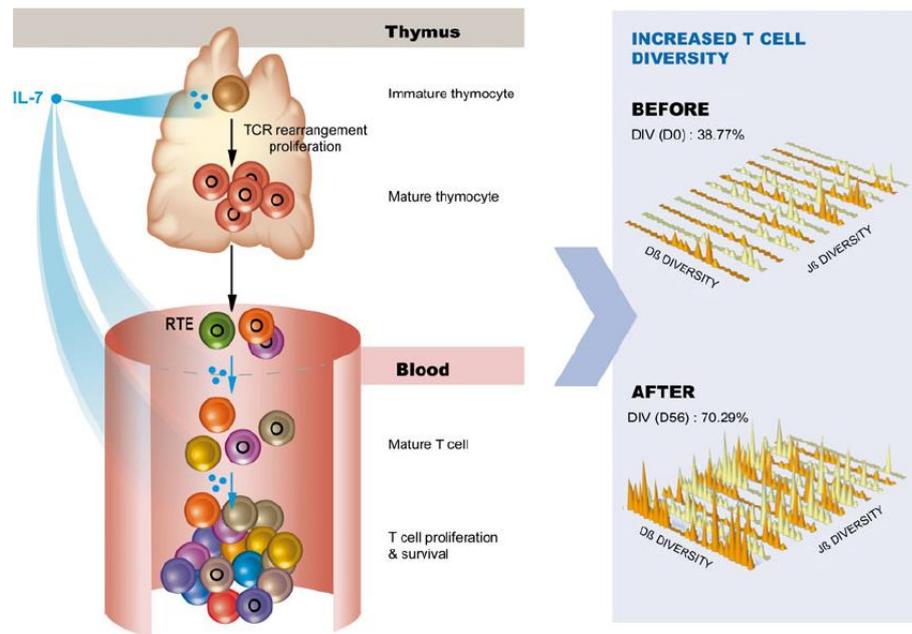


Figure 21 : Restauration de la diversité du répertoire T sous l'effet de l'IL-7 [91]

4.6.2.2. Effet lymphoprolifératif

L'IL-7rh entraîne une augmentation de la prolifération lymphocytaire, par accroissement du cycle cellulaire, mis en évidence par l'expression du marqueur Ki-67. En temps normal, seulement 5 % des L_T circulants sont en division et suite à l'administration d'IL-7rh, on observe que plus de 50 % des L_T circulants se divisent [74, 95]. Cet effet n'est pas dose-dépendant et il est mis en évidence uniquement jusqu'à 28 jours après le traitement [94].

Enfin, l'IL-7 induit le retour des L_T dans les tissus lymphoïdes et les organes cibles, comme l'indique la Figure 22. Ceci est très intéressant chez les patients atteints de cancer car les L_T cytotoxiques sont alors présents au niveau des organes cibles pour détruire les cellules cancéreuses [91].

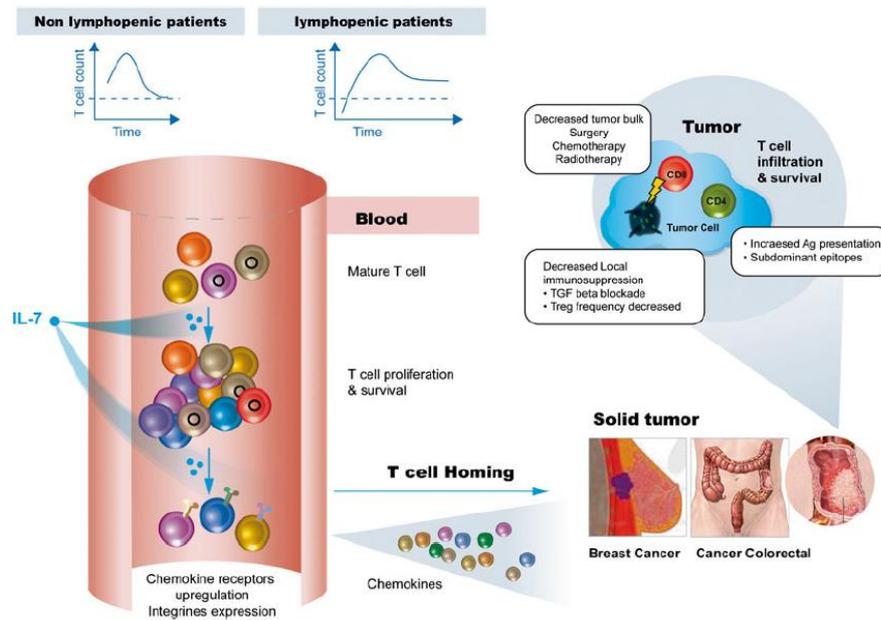


Figure 22 : Mécanismes d'action possibles d'une immunothérapie par l'IL-7 chez les patients atteints de cancer [91]

4.6.3. Perspectives dans le sepsis

Les dysfonctions lymphocytaires développées par les patients atteints de CS sont très similaires à celles observées chez les patients infectés par le VIH. L'administration d'IL-7rh dans cette pathologie a montré de très bons résultats en terme de récupération des fonctions lymphocytaires. Ceci laisse présager que l'utilisation d'IL-7rh dans la prise en charge des patients en CS serait bénéfique et permettrait d'améliorer leur survie.

Dans ce contexte, et avant d'envisager un essai clinique, nous avons réalisé une étude préclinique évaluant l'intégrité et la fonctionnalité de la voie de signalisation de l'IL-7 chez les patients atteints de CS. Cette étude préclinique, qui constitue notre travail, est présentée dans la suite de ce manuscrit.

TRAVAIL PERSONNEL

1. INTRODUCTION

Les syndromes septiques constituent un groupe de pathologies complexes résultant d'une réaction inflammatoire systémique exacerbée en réponse à une infection. Ils représentent la première cause de mortalité des patients hospitalisés en réanimation malgré les nombreux efforts réalisés ces vingt dernières années pour identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Le CS représente la forme la plus grave avec une mortalité pouvant atteindre 40 à 50 % [63].

Il est aujourd'hui clairement établi que l'immunosuppression qui touche les patients atteints de CS est corrélée à un risque accru de développer une IN et à une mortalité plus élevée. Les thérapies immunostimulantes sont actuellement considérées dans les syndromes septiques comme potentiel traitement adjuvant, et des essais cliniques commencent à apparaître [67].

Parmi les molécules candidates, l'IL-7 s'est montrée efficace dans d'autres situations cliniques (*i.e.* SIDA, cancérologie) où les dysfonctions lymphocytaires sont comparables à celles observées chez les patients septiques (*e.g.* anergie lymphocytaire, diminution du répertoire T, altérations phénotypiques, *etc.*). De nombreux essais cliniques sont en cours dans ces pathologies et les premiers résultats semblent très prometteurs, notamment en termes de tolérance du produit et de restauration des fonctions lymphocytaires.

A ce jour, aucune étude chez l'homme n'a été conduite avec l'IL-7 dans les syndromes septiques. Des études de modèles murins de péritonite ont montré une amélioration de la survie de souris septiques après injection d'IL-7 recombinante, par une diminution de l'apoptose permettant une restauration de la lymphocytose. L'IL-7 a par ailleurs entraîné une augmentation de la production d'IFN- γ par les L_TCD₈ [66, 96, 97].

C'est dans ce contexte que nous avons décidé de réaliser une étude préclinique, première étape nécessaire à la mise en place d'un essai clinique utilisant l'IL-7 chez les patients atteints de CS. L'objectif de ce travail était d'évaluer différents paramètres liés à l'IL-7 (IL-7 circulante, expression cellulaire du CD₁₂₇, CD₁₂₇ soluble, prolifération lymphocytaire) chez les patients atteints de CS.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. PATIENTS

L'ensemble des patients inclus dans ce travail a été recruté dans les services de réanimation du Centre Hospitalier Lyon Sud. Il s'agissait d'hommes et de femmes âgés de plus de 18 ans, présentant un CS, défini selon les critères ACCP/SCCM (cf. 2.1) [1]. L'heure de début du choc, considérée comme $t = 0$, correspondait à la première administration d'amines vasoactives.

Nous avons exclu de l'étude les patients présentant un déficit immunitaire (aplasie médullaire, traitement immunosuppresseur à forte dose ou infection par le VIH).

Le recueil des données cliniques a intégré des caractéristiques démographiques (âge, sexe), des données propres à l'infection (site infectieux, agent pathogène en cause, acquisition à l'hôpital ou non). Il a également comporté des informations propres au patient (présence de co-morbidités, sévérité) et à son évolution clinique (développement d'une IN après 14 jours d'évolution ou décès à J28). La sévérité a été évaluée par les scores SAPS II (*Simplified Acute Physiologic Score II*), calculé au moment de l'inclusion du patient dans le protocole, et SOFA, calculé après 24 h en réanimation.

L'état d'immunosuppression des patients a également été évalué. Les paramètres immunologiques considérés étaient la numération des L_TCD_4 , le pourcentage de L_T régulateurs et le pourcentage d'expression de HLA-DR monocytaire. Tous ces paramètres ont été mesurés à J3-4 après le début du choc.

2.2. PROTOCOLE D'ETUDE

Nous avons réalisé une étude ambispective (à la fois rétrospective et prospective), longitudinale dans laquelle nous avons mesuré tout d'abord la concentration plasmatique d'IL-7 chez les patients septiques. Ensuite, nous avons évalué le niveau d'expression du CD_{127} à la surface des L_TCD_4 et des L_TCD_8 . Nous avons ensuite dosé la forme circulante du récepteur de l'IL-7 (s CD_{127}) chez les patients. Enfin, nous avons étudié l'effet *ex vivo* de l'IL-7 sur les capacités prolifératives des lymphocytes des patients. Ces différentes techniques ont été réalisées à plusieurs temps du suivi des patients et en parallèle chez 31 témoins, volontaires sains (VS) travaillant au laboratoire d'immunologie de l'hôpital Edouard Herriot. Le protocole de l'étude est résumé dans la Figure 23.

2.3.3. Principe

Le dosage a été effectué par technologie Luminex, sur la station de travail Bio-Plex commercialisée par le laboratoire Biorad.

Ce dosage correspond à un test immunométrique de type sandwich avec détection par fluorescence, dans lequel l'anticorps de capture est fixé sur des billes magnétiques fluorescentes. Les billes sont colorées par deux fluorophores différents (rouge et infrarouge), leurs intensités respectives permettant de définir une région correspondant à chaque type de billes (une bille permettant de mesurer un paramètre).

Lorsque l'échantillon est mis en présence des billes, l'IL-7 plasmatique va se lier à l'anticorps de capture fixé sur la bille. Un deuxième anticorps anti-IL-7 biotinylé va permettre la détection de la molécule d'intérêt. La streptavidine couplée à la phycoérythrine (PE - fluorophore émettant à 575 nm) est ensuite ajoutée pour la révélation. La réaction est schématisée sur la Figure 24.

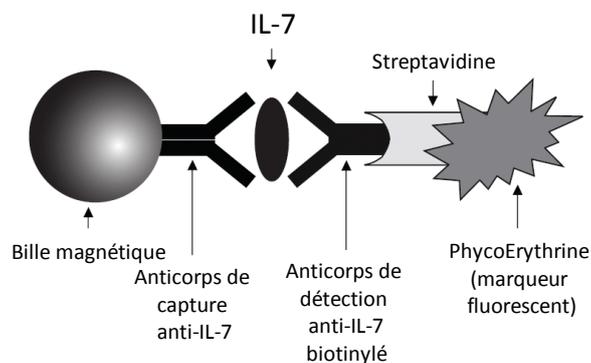


Figure 24 : Réaction se déroulant à la surface de la bille magnétique lors du dosage de l'IL-7

Au niveau de la station de travail Bio-Plex, les billes vont être excitées successivement par deux lasers : l'un va exciter les billes fluorescentes pour permettre de définir la région correspondante et donc le paramètre analysé, l'autre laser va exciter la PE fixée à l'anticorps de détection afin de quantifier la réaction : la fluorescence émise est proportionnelle à la concentration d'IL-7 présente dans l'échantillon.

2.3.3.1. Caractéristiques du kit de dosage

Les caractéristiques du kit de dosage sont issues du fabricant. La limite de détection est de 0,5 pg/mL. Il s'agit de la valeur issue de la droite d'étalonnage au point défini par la moyenne du bruit de fond plus deux écarts-type.

Les coefficients de variation intra-test sont de 5 % pour une concentration en IL-7 de 500 pg/mL et 2 % pour une concentration en IL-7 de 125 pg/mL. Ils sont calculés à partir de 3 échantillons dosés

sur une même plaque. Les coefficients de variation inter-test sont de 16,3 % pour une concentration en IL-7 de 925 pg/mL et 6 % pour une concentration en IL-7 de 300 pg/mL. Ils sont calculés à partir de 3 échantillons dosés sur cinq plaques différentes.

Les valeurs normales du kit, mesurées à partir du dosage en duplicate de 66 échantillons de sujets sains, vont de 0,6 à 13 pg/mL.

2.4. EXPRESSION CELLULAIRE DU CD₁₂₇

2.4.1. Échantillons

Les marquages ont été réalisés dès réception, sur des échantillons de sang frais, prélevés sur tube EDTA. Le volume utilisé était de 100 µL pour chaque marquage.

2.4.2. Réactifs

Pour les marquages de cytométrie en flux, nous avons utilisé des anticorps anti-CD₁₂₇ couplés à la PE, des anti-CD₄ couplés à la PE Texas red (ECD), des anti-CD₈ couplés à l'ECD, des anti-CD₂₅ couplés à la PE-cyanine 5 (PC5), des anti-CD₃ couplés à la PC5, commercialisés par Beckman Coulter. Des billes Flow Count et une solution de lyse (réactif de lyse, réactif stabilisant et réactif de fixation), commercialisés par Beckman Coulter, ont également été utilisées.

2.4.3. Principe

100 µL de sang total ont été incubés avec les anticorps marqués à des fluorochromes (CD₁₂₇, CD₄, CD₂₅ d'une part, et CD₁₂₇, CD₈, CD₃ d'autre part). Une lyse des globules rouges a été pratiquée après 10 min d'incubation (TQ PREP, Beckman Coulter). Ensuite, 100 µL de billes de calibration ont été ajoutées dans chaque tube juste avant de les passer sur le cytomètre FC500, Beckman Coulter. Les billes de calibration ont permis d'obtenir les valeurs absolues de L_TCD₄.

2.4.4. Marquage CD₁₂₇ / CD₄ / CD₂₅

Les lymphocytes CD₄⁺ ont été isolés par un histogramme CD₄/structure. Un histogramme CD₂₅/CD₁₂₇ fenêtré sur les CD₄⁺ a permis de mettre en évidence le pourcentage de L_TCD₄ régulateurs (CD₄⁺ CD₂₅⁺ CD₁₂₇⁻) d'une part, et de L_TCD₄ effecteurs d'autre part (CD₄⁺ CD₂₅⁻ CD₁₂₇⁺), cf. Figure 25.

Pour notre étude, nous avons évalué l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du CD₁₂₇ sur les L_TCD₄ totaux d'une part, puis sur les L_TCD₄ régulateurs et les L_TCD₄ effecteurs d'autre part.

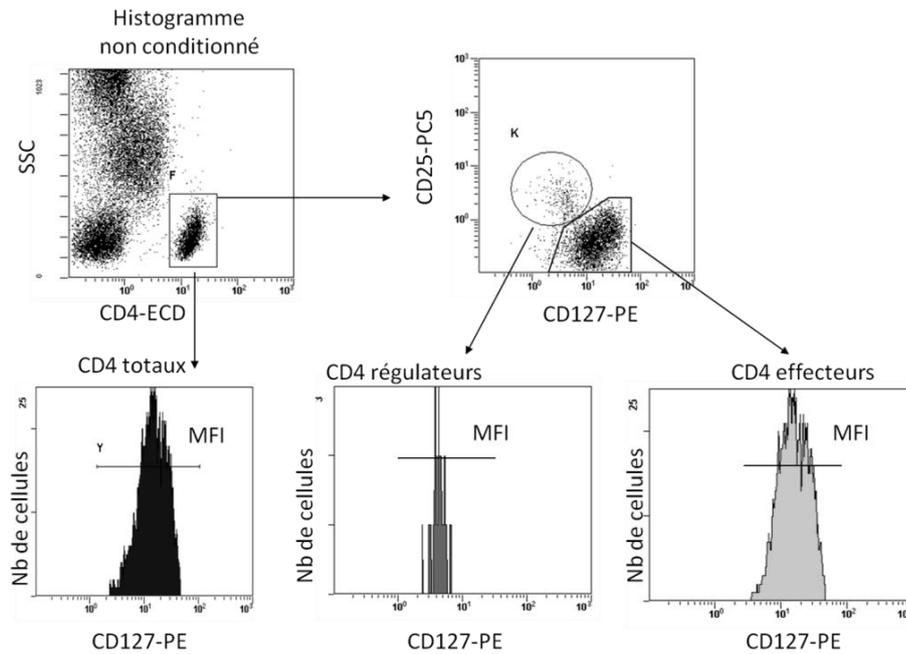


Figure 25 : Evaluation de l'expression du CD₁₂₇ sur les différentes populations de L_TCD₄

2.4.5. Marquage CD₁₂₇ / CD₈ / CD₃

Un marquage CD₁₂₇/CD₈/CD₃ a permis d'évaluer l'expression du CD₁₂₇ sur les L_TCD₈.

L'analyse (cf. Figure 26) nous a permis d'isoler les L_T par un premier histogramme CD₃/structure. Un histogramme CD₃/CD₈ a ensuite permis de sélectionner la population d'intérêt (L_TCD₈). Enfin, un histogramme monoparamétrique du CD₁₂₇ fenêtré sur les L_TCD₈ a permis de définir le pourcentage de L_TCD₈ exprimant le CD₁₂₇, ainsi que son IMF.

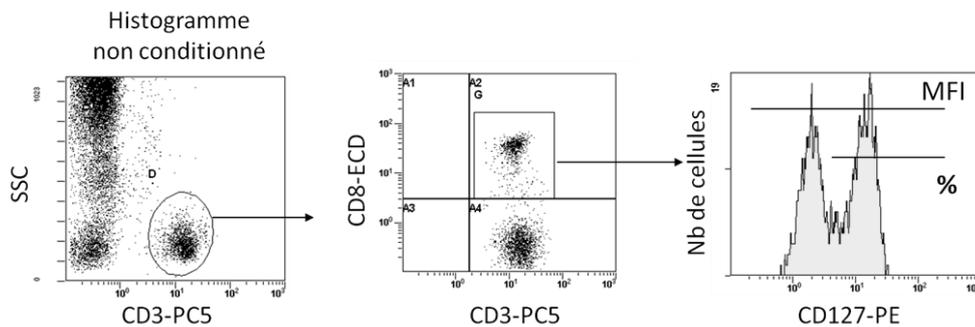


Figure 26 : Evaluation de l'expression du CD₁₂₇ sur les L_TCD₈

Parallèlement, un histogramme monoparamétrique du CD₃ sur la population de cellules exprimant le CD₁₂₇ a été réalisé, afin d'étudier quelle(s) sous-population(s) lymphocytaire(s) exprime(nt) ce marqueur.

2.5. DOSAGE DU CD₁₂₇ SOLUBLE

Il a été démontré qu'une augmentation de la forme plasmatique du CD₁₂₇ peut inhiber l'action de l'IL-7 [98]. D'autre part, on sait que certaines situations pathologiques comme une infection par le VIH peuvent augmenter la concentration plasmatique de cette forme soluble de CD₁₂₇ [98]. C'est pour cela que nous avons voulu mesurer ce paramètre chez nos patients afin de pouvoir détecter une éventuelle augmentation qui pourrait être une source d'échec thérapeutique de l'IL-7rh.

2.5.1. Échantillons

Un même aliquot de plasma a permis les dosages de l'IL-7 et du CD₁₂₇ soluble.

La prise d'essai pour le dosage du CD₁₂₇ soluble a été de 85 µL. Les échantillons ont été passés en duplicate.

2.5.2. Réactifs utilisés

Pour réaliser notre ELISA sandwich, nous avons utilisé un anticorps de souris monoclonal anti-CD₁₂₇ humain, clone R34.34, Beckman Coulter® et un anticorps de chèvre polyclonal anti-CD₁₂₇ biotinylé, R&D Systems®. Le standard utilisé était du recombinant human IL-7Rα / CD₁₂₇ Fc chimera, R&D Systems®. La Streptavidin-HRP (péroxydase de raifort), R&D Systems® associée au substrat colorimétrique TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine), Biomérieux® a servi de révélateur.

Plusieurs tampons ont été utilisés, notamment un tampon bicarbonaté pour le coating des puits, du PBS (Tampon phosphate salin)-Tween₂₀0,05 % pour les lavages, du PBS-Tween₂₀0,05 %/10 %FBS (Sérum de veau foetal) pour le blocage et du PBS/5 %FBS pour les dilutions.

2.5.3. Principe

Il s'agit d'un dosage immunométrique de type ELISA sandwich, dont la réaction est représentée sur la Figure 27 [98]. Des microplaques 96-puits sont revêtues d'anticorps de capture après une incubation de 24 h, puis fixées par une solution protéique pendant une heure, puis lavées. Les échantillons sont ensuite ajoutés et incubés pendant une heure. Le CD₁₂₇ soluble présent dans l'échantillon se fixe alors à l'anticorps. Après lavage, l'anticorps de détection biotinylé est incubé pendant une heure. L'ajout de streptavidine liée à la peroxydase de raifort, puis du substrat de l'enzyme, va entraîner une réaction colorée, dont l'absorbance est proportionnelle à la concentration en CD₁₂₇ soluble présent dans l'échantillon. Après arrêt de la réaction du substrat sur l'enzyme, l'absorbance est mesurée à 450 nm par un lecteur de microplaques (PerkinElmer).

Les concentrations des échantillons ont été extrapolées à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée à partir du standard [99].

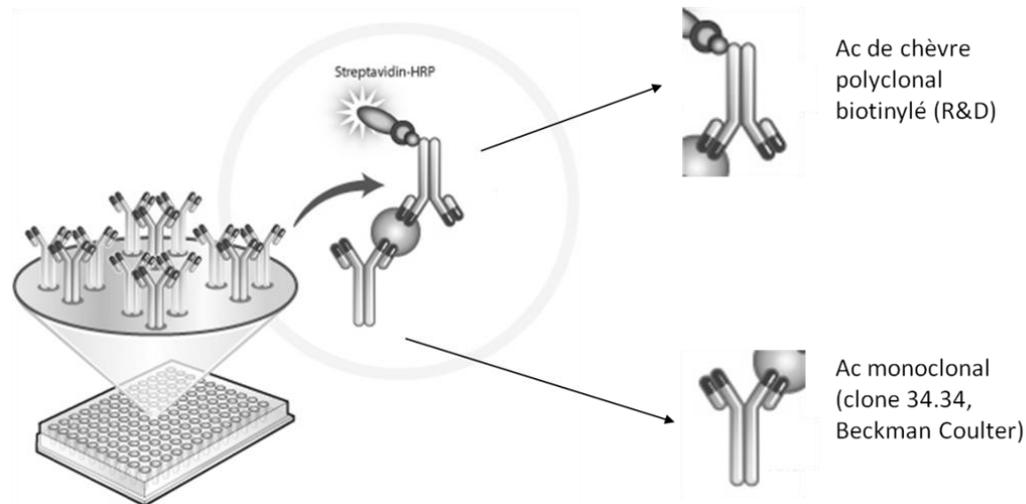


Figure 27 : Dosage du CD₁₂₇ soluble par ELISA

2.6. PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE

Des mesures fonctionnelles ont été réalisées afin de voir si l'IL-7 est capable, *in vitro*, de restaurer la capacité des lymphocytes à proliférer. En effet, on sait que, chez les patients atteints de CS, une anergie lymphocytaire s'installe très rapidement avec une diminution nette de la prolifération lymphocytaire *in vitro* [42, 58, 61]. Nous avons donc cherché, par cette technique, à mettre en évidence un effet bénéfique direct de l'IL-7 sur la fonctionnalité lymphocytaire des patients atteints de CS.

2.6.1. Échantillons

La technique a été effectuée sur un échantillon frais de sang total prélevé sur EDTA à J3-4. La prise d'essai a été variable et adaptée en fonction de la lymphocytose du sujet : 2 à 5 mL ont été utilisés.

2.6.2. Réactifs

Le milieu de séparation des lymphocytes utilisé est du Ficoll, d'une densité de 1,077 (PAA Laboratories, Autriche). Du PBS est également utilisé pour les dilutions du sang et les lavages (Biomérieux, France). Le milieu de culture est composé de RPMI avec tampon HEPES (Eurobio, France), de L-glutamine (Lonza, Belgique), de Pénicilline Streptomycine (Sigma-Aldrich, Etats-Unis), de Fungizone (Bristol-Myers Squibb, Etats-Unis) et de sérum AB obtenu à partir d'un pool de VS.

Les agents stimulants utilisés ont été des billes agonistes anti-CD₂ anti-CD₃ anti-CD₂₈ (Miltenyi Biotec, Allemagne) et de l'IL-7rh (R&D Systems, Etats-Unis).

Pour la détection, nous avons utilisé de la thymidine tritiée (20 µCi/ml, PerkinElmer, Etats-Unis).

2.6.3. Principe

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées par gradient de densité de Ficoll. Les PBMC ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS stérile puis reprises dans du milieu de culture. Les cellules ont été conservées à 4°C avant la mise en culture.

Un marquage des cellules a été réalisé afin de définir la concentration cellulaire et la pureté obtenue après le Ficoll. Les cellules ont été marquées par un anticorps anti-CD₄₅ couplé à la PC5, marqueur pan leucocytaire. Un histogramme taille/CD₄₅ a permis de mettre en évidence les PBMC (Ly et monocytes), comme le montre la Figure 28. La quantification a pu être effectuée par ajout de billes calibrées.

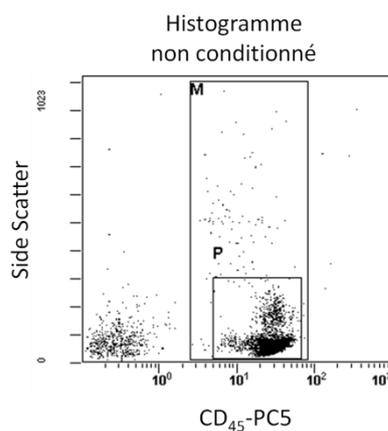


Figure 28 : Quantification des PBMC après ficoll (P = lymphocytes + monocytes)

Side scatter : permet d'évaluer la taille et la viabilité cellulaire, CD₄₅ : marqueur pan leucocytaire

Les cellules ont ensuite été mises en culture à la concentration de $0,5 \cdot 10^6$ cellules/mL (50 000 cellules par puits, 100 µL) dans des microplaques 96 puits et ont été stimulées selon différentes conditions, chacune étant réalisée en triplicat :

- aucune stimulation ou condition contrôle
- stimulation par l'IL-7 à 100 ng/mL
- stimulation par des billes agonistes anti-CD₂ anti-CD₃ anti-CD₂₈
- stimulation simultanée par des billes agonistes et de l'IL-7 à 100 ng/mL

Les cellules ont été incubées pendant 48 h à 37°C sous 5 % de CO₂.

Une incorporation de thymidine tritiée (20 µCi/ml, PerkinElmer, Etats-Unis) a été réalisée pendant 24 h avant la récolte des cellules, effectuée par un récolteur automatique (PerkinElmer) sur

des filtres en fibre de verre. La radioactivité incorporée a été mesurée par comptage de scintillation en milieu liquide dans le compteur PerkinElmer Top Count.

2.7. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism® (version 5.03, logiciel GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Nous avons utilisé des tests non paramétriques : test de Mann-Whitney pour comparer la population de patients en CS et les VS. Des tests de Wilcoxon ont été utilisés pour étudier l'évolution des paramètres chez les patients au cours du temps.

Les corrélations qui ont été étudiées ont été évaluées par des tests non paramétriques de Spearman.

Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Pour la présentation des résultats, les variables catégorielles sont présentées en nombre de cas et pourcentages entre parenthèses, tandis que les variables numériques sont représentées par la moyenne et l'écart-type.

Pour des raisons techniques, l'ensemble des analyses n'a pu être effectué chez tous les patients. Nous détaillerons donc, pour chaque analyse, le nombre de patients étudiés. Nous avons nécessairement vérifié au préalable que les données cliniques et immunologiques des différents "groupes" de patients n'étaient pas statistiquement différentes. Les résultats obtenus chez les patients atteints de CS ont été comparés à ceux obtenus pour les VS, aux deux temps du suivi (J1-2 et J3-4). Nous avons également comparé les résultats en fonction de la survenue d'IN et de la mortalité des patients.

3. RESULTATS

3.1. PATIENTS

Au total, 55 patients et 31 VS ont été inclus dans l'étude. L'ensemble des données cliniques et immunologiques est résumé dans le Tableau 7. L'âge moyen des patients était de 69 ans, ils étaient constitués majoritairement d'hommes (65 %). Ces données correspondent à celles que l'on retrouve généralement dans la littérature [3, 11]. Les patients avaient un score SAPS II de 62,5 en moyenne et un score SOFA de 10,8 en moyenne, qui témoignent de la gravité de leur atteinte. 65 % des patients présentaient des co-morbidités. La mortalité de notre population était de 38 % et une IN est survenue chez 18 % des patients.

Les patients inclus dans l'étude présentaient les caractéristiques d'immunosuppression classiquement retrouvées chez les patients atteints de CS. En effet, en considérant les valeurs normales du laboratoire pour les paramètres immunologiques d'individus sains de même âge, les patients présentaient une lymphopénie, une augmentation du pourcentage de L_T régulateurs et une diminution d'expression monocyttaire de HLA-DR.

Tableau 7 : Données cliniques et paramètres immunologiques mesurés à J3-4 après le début du choc.

Les variables numériques sont représentées en moyenne \pm écart-type tandis que les variables catégorielles sont représentées en nombre de cas et pourcentages entre parenthèses. SAPS-2 : *Simplified Acute Physiologic Score II* calculé à l'inclusion du patient. SOFA : *Sequential Organ Failure Assessment*, mesuré après 24 h en réanimation. mHLA-DR : pourcentage de monocytes exprimant HLA-DR parmi les monocytes. L_T régulateurs : pourcentage de L_TCD₄⁺CD₂₅⁺CD₁₂₇⁻ parmi les L_TCD₄. Les valeurs normales pour les paramètres immunologiques sont indiquées entre parenthèses.

Données cliniques des 55 patients			Données cliniques des 31 volontaires sains				
Age (années)		69 \pm 13	Age (années)		50 \pm 13		
Genre	Masculin	36 (65)	Genre	Masculin	18 (58)		
	Féminin	19 (35)		Féminin	13 (42)		
SAPS-2 à l'admission		62 \pm 20	Paramètres immunologiques des patients à J3-4				
SOFA		11 \pm 3					
Co-morbidités	0	19 (35)					
	≥ 1	36 (65)					
Type d'infection	Communautaire	33 (60)					
	Nosocomiale	22 (40)					
Infection	Bacille à Gram -	16 (29)				mHLA-DR (%)	41,1 \pm 26,2
	Cocci à Gram +	15 (27)				(> 90 %)	
	Fungi	2 (4)				mHLA-DR (nombre de sites)	6631 \pm 6917
	Autres	11 (20)				(> 15 000)	
Site d'infection	Pulmonaire	20 (36)	L_TCD₄ (cellules/μL)	353 \pm 218			
	Abdominal	13 (24)	(500 à 1250)				
	Autres	22 (40)	L_T régulateurs (%)	10,9 \pm 5,3			
Décès		21 (38)	(5 à 7 %)				
Infection nosocomiale		10 (18)					

3.2. IL-7 PLASMATIQUE

3.2.1. Choc septique *versus* volontaires sains

L'IL-7 a été mesurée chez 24 patients en CS et 26 VS. La concentration plasmatique d'IL-7 était significativement plus élevée chez les patients en CS par rapport aux VS, et ce, quel que soit le temps du suivi ($p < 0,005$). Aucune évolution au cours du temps n'a été observée chez les patients. Les résultats sont représentés dans la Figure 29.

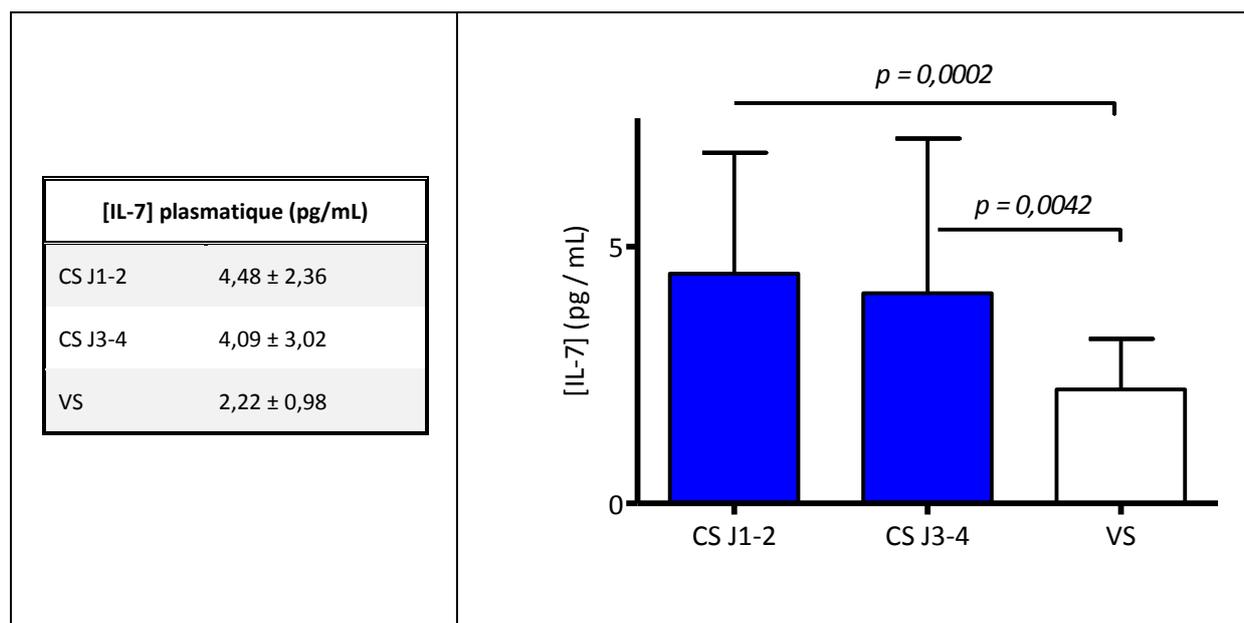


Figure 29 : Concentrations plasmatiques d'IL-7 en pg / mL chez les patients à J1-2 (CS J1-2) et à J3-4 (CS J3-4) et chez les volontaires sains (VS)

Représentées par la moyenne et l'écart-type. Le test non paramétrique de Mann - Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs entre les groupes.

3.2.2. IL-7 et infection nosocomiale

Parmi les 24 patients ayant eu un dosage d'IL-7, 4 patients (soit 17 %) ont développé une IN. Les concentrations d'IL-7 étaient significativement plus élevées chez les patients sans IN par rapport aux VS, tandis qu'elles n'étaient pas différentes entre les patients développant une IN et les VS. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les patients infectés et non infectés ($p = 0,11$ à J1-2 et $p = 0,15$ à J3-4). Ceci pourrait s'expliquer par le faible nombre de patients étudiés (seulement 4 patients ont développé une IN). Aucune évolution au cours du temps n'a été observée chez les patients. Les résultats sont représentés dans la Figure 30.

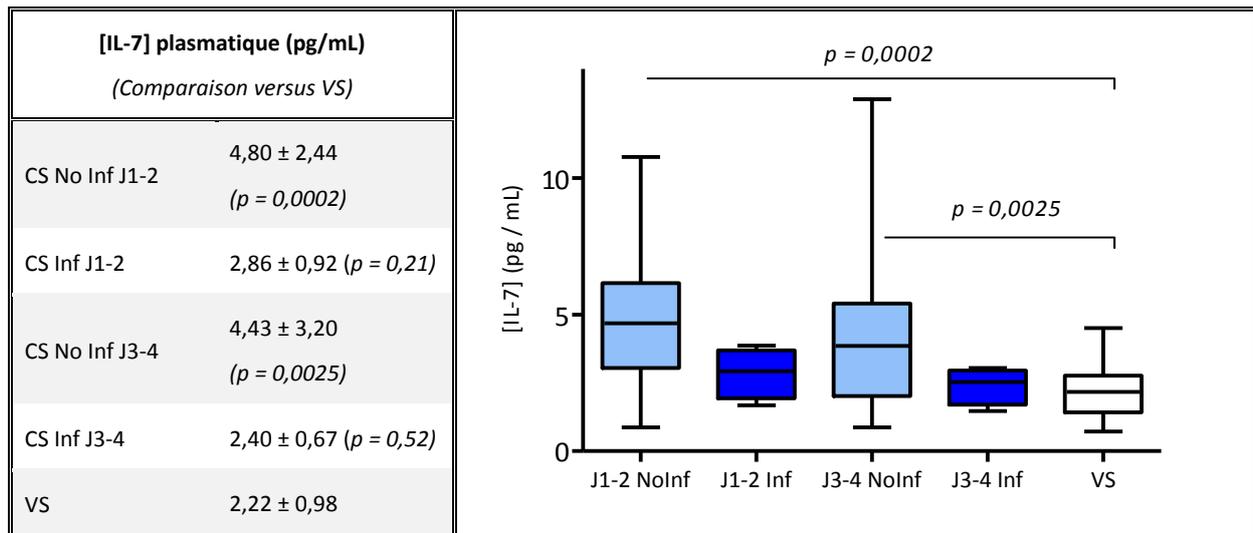


Figure 30 : Concentrations plasmatiques d'IL-7 en pg / mL chez les patients atteints de CS à J1-2 et à J3-4 et chez les volontaires sains (VS), en tenant compte de la survenue ou non d'une IN.

Les résultats sont représentés par des boîtes à moustache. Le test non paramétrique de Mann - Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs entre les groupes. IN = Infection nosocomiale, NoInf = absence d'IN et Inf = patient développant une IN

3.2.3. IL-7 et mortalité

Parmi les 24 patients ayant eu un dosage d'IL-7 plasmatique, 9 patients sont décédés durant les 28 premiers jours du suivi (soit 37,5 % de mortalité). Les concentrations d'IL-7 étaient significativement plus élevées chez les patients par rapport aux VS, que l'on considère le caractère survivant ou non survivant. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes "survivant" et "non survivant" (*p* = 0,68 à J1-2 et *p* = 0,91 à J3-4). Aucune évolution au cours du temps n'a été observée chez les patients. Les résultats sont représentés dans la Figure 31.

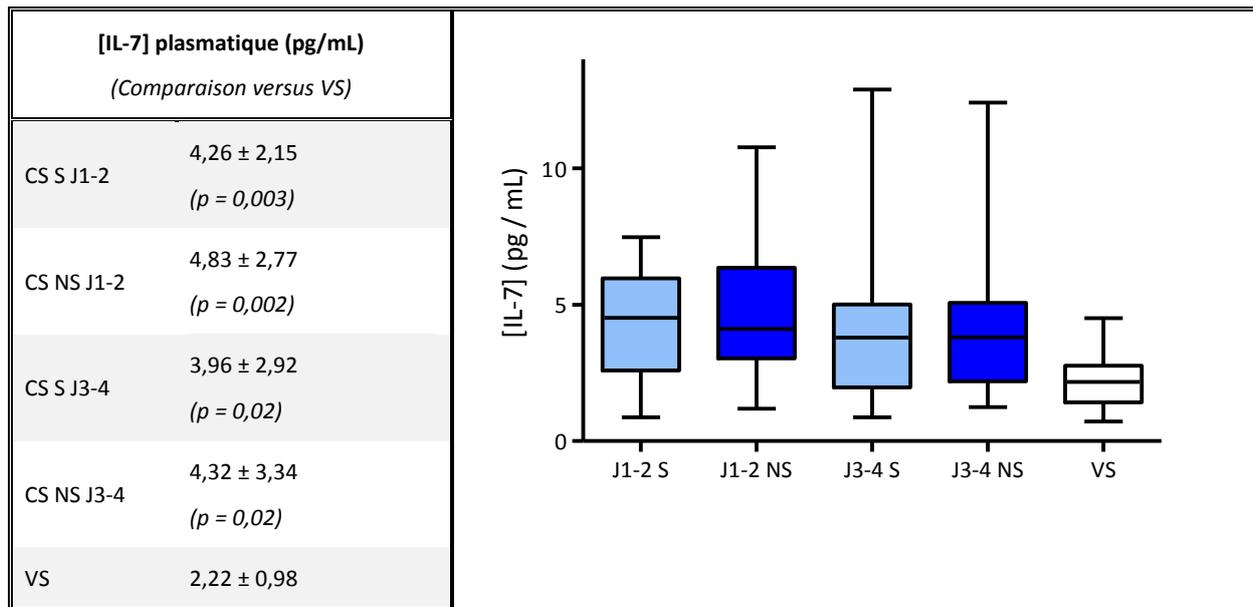


Figure 31 : Concentrations plasmatiques d'IL-7 en pg / mL chez les patients à J1-2 et à J3-4 et chez les volontaires sains (VS), en tenant compte de la mortalité.

Les résultats sont représentés par des boîtes à moustache. Le test non paramétrique de Mann - Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs entre les groupes. S = patient survivant et NS = patient non survivant

3.2.4. Corrélations entre la concentration plasmatique d'IL-7 et les L_TCD₄

Des corrélations inverses ont été décrites entre la concentration plasmatique d'IL-7 et la numération des L_TCD₄, en particulier chez les patients infectés par le VIH [74, 100]. C'est pourquoi nous avons évalué la corrélation entre la concentration plasmatique d'IL-7 et la numération des L_TCD₄ chez les patients septiques. Comme l'indique la Figure 32, une faible corrélation positive a été observée à J1-2 (*r* = 0,21 ; *p* = 0,33 ; *n* = 24). Cette corrélation positive était cependant plus marquée à J3-4 (*r* = 0,40 ; *p* = 0,05 ; *n* = 24).

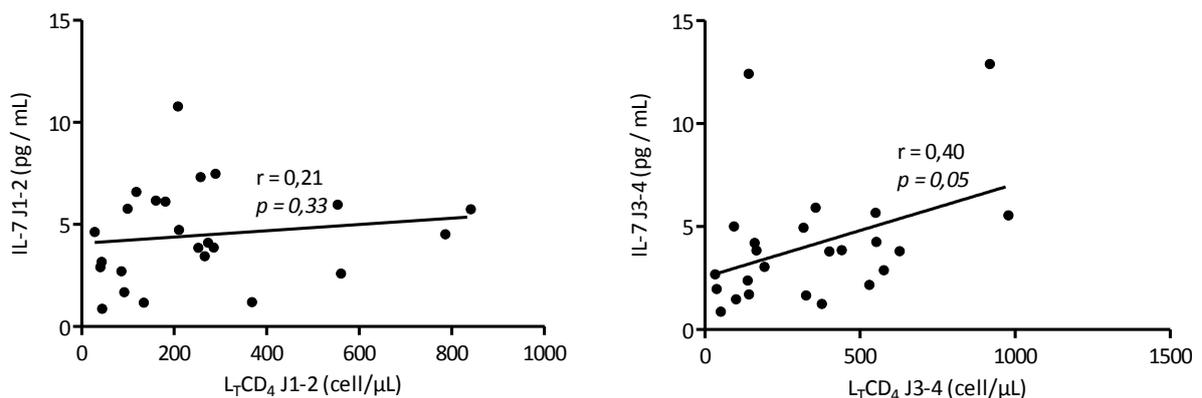


Figure 32 : Corrélations entre la concentration plasmatique d'IL-7 en pg / mL et le nombre de L_TCD₄ en cellules / μL à J1-2 et à J3-4.

Le test non paramétrique de Spearman a été utilisé.

3.3. EXPRESSION DU CD₁₂₇ SUR LES LEUCOCYTES

Nous présentons dans cette partie uniquement la comparaison des patients atteints de CS par rapport aux VS sans considérer la survenue d'IN ou le décès du patient. En effet, aucune différence significative d'expression du CD₁₂₇ n'a été mise en évidence entre les groupes de patients "survivants" et "non survivants" d'une part, et "infectés" et "non infectés" d'autre part, quelle que soit la sous-population lymphocytaire considérée.

3.3.1. Sous-populations lymphocytaires exprimant CD₁₂₇

Tout d'abord, et pour vérifier les données de la littérature [82, 83], nous avons étudié quelle(s) sous-population(s) lymphocytaire(s) exprimai(en)t le CD₁₂₇. Chez tous nos sujets, tous les leucocytes exprimant le CD₁₂₇ étaient des Ly qui exprimaient également la molécule CD₃. Comme le montre la Figure 33, il s'agissait donc uniquement de L_T. C'est pourquoi nous avons étudié l'expression du CD₁₂₇ sur les L_TCD₄ et les L_TCD₈.

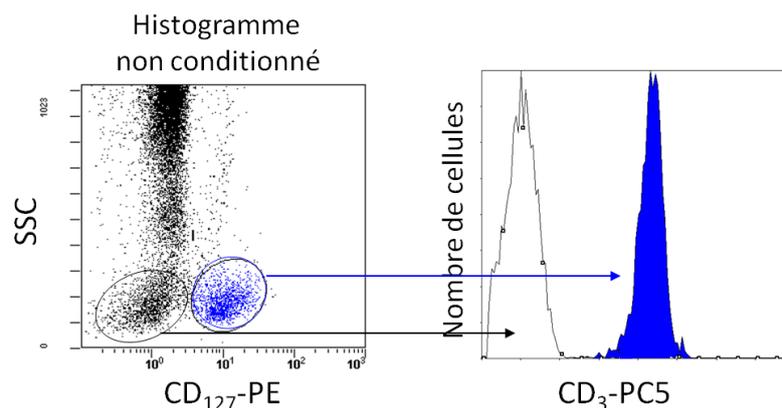


Figure 33 : Expression du CD₃ sur les Lymphocytes exprimant le CD₁₂₇

Représentée sur un overlay : histogrammes monoparamétriques superposés (Ly CD₁₂₇⁺ en bleu, et Ly CD₁₂₇⁻ en blanc)

3.3.2. Expression du CD₁₂₇ sur les lymphocytes CD₄⁺

La mesure de l'expression du CD₁₂₇ sur les Ly CD₄⁺ a été effectuée chez 23 patients en CS et 37 VS. Les IMF ont été mesurées, elles sont liées au nombre de molécules de CD₁₂₇ présentes à la surface d'un Ly CD₄⁺. Aucune différence significative n'a été observée entre les IMF mesurées chez les patients et chez les VS, quel que soit le temps du suivi ($p = 0,83$ à J1-2 et $p = 0,06$ à J3-4). Nous avons cependant mis en évidence une légère diminution de l'IMF du CD₁₂₇ sur les CD₄⁺ au cours du temps chez les patients ($14,1 \pm 4,6$ à J1-2 et $12,1 \pm 2,6$ à J3-4). Les résultats sont présentés dans la Figure 34.

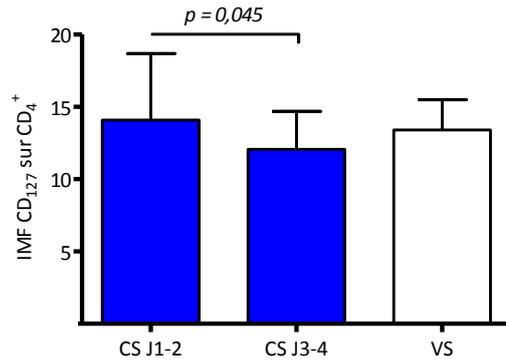


Figure 34 : Intensité moyenne de fluorescence (IMF) du CD₁₂₇ sur les lymphocytes CD₄⁺ chez les patients atteints de CS à J1-2 (CS J1-2) et à J3-4 (CS J3-4) et chez les volontaires sains (VS).

Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour comparer l'évolution des valeurs au cours du temps.

3.3.3. Expression du CD₁₂₇ sur les lymphocytes CD₈⁺

La mesure de l'expression du CD₁₂₇ sur les Ly CD₈⁺ a été effectuée chez 19 patients en CS et 32 VS. À J1-2, aucune différence n'a été observée entre les IMF obtenues chez les patients et chez les VS ($p = 0,27$). À J3-4, l'IMF du CD₁₂₇ sur les CD₈⁺ était légèrement plus faible chez les patients ($8,4 \pm 2,5$) par rapport aux VS ($10,6 \pm 2,2$, $p = 0,007$). Nous n'avons pas observé de diminution de l'expression du CD₁₂₇ sur les CD₈⁺ chez les patients au cours du temps ($p = 0,09$). Les résultats sont représentés dans la Figure 35.

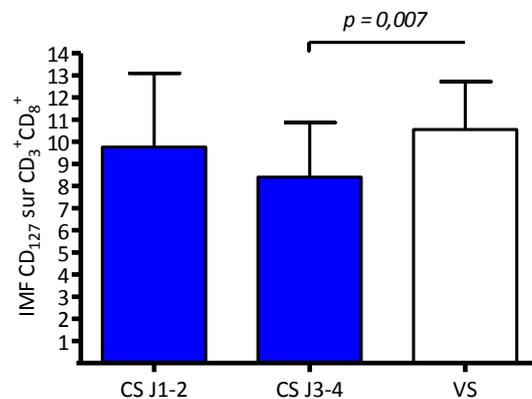


Figure 35 : Intensités moyennes de fluorescence (IMF) du CD₁₂₇ sur les lymphocytes CD₈⁺ chez les patients atteints de CS à J1-2 (CS J1-2) et à J3-4 (CS J3-4) et chez les volontaires sains (VS)

Les résultats sont représentés par la moyenne et l'écart-type. Le test non paramétrique de Mann - Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs des différents groupes.

Lorsque nous avons considéré le pourcentage de Ly CD₈⁺ exprimant le CD₁₂₇ parmi l'ensemble des Ly CD₈⁺, nous n'avons pas observé de différence entre les patients en CS et les VS, quel que soit le temps du suivi ($p = 0,51$ à J1-2 et $p = 0,23$ à J3-4). Les résultats sont représentés dans la Figure 36.

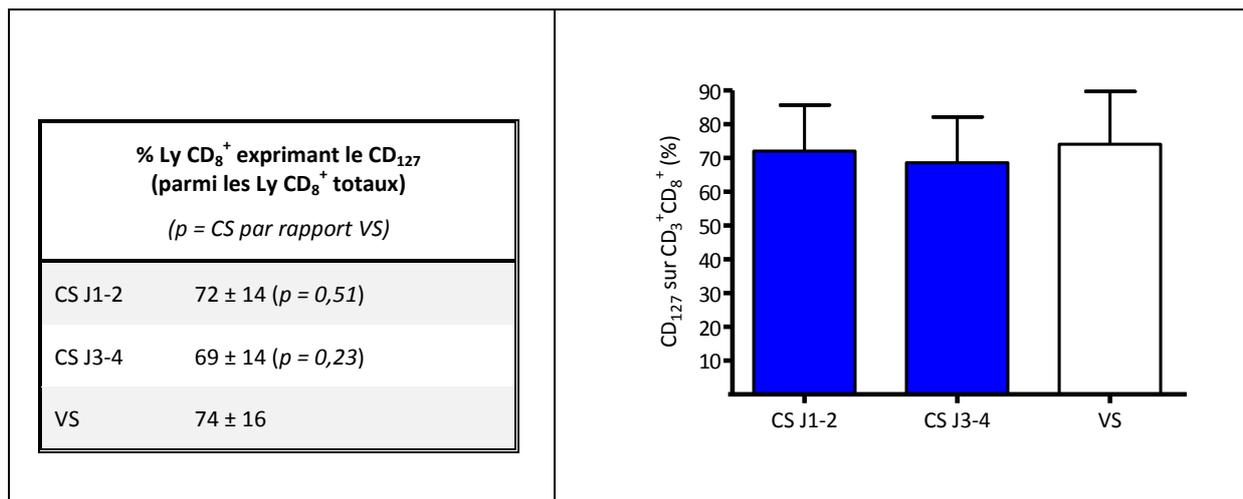


Figure 36 : Pourcentages de Ly CD₈⁺ exprimant le CD₁₂₇ parmi les Ly CD₈⁺ chez les patients atteints de CS à J1-2 (CS J1-2) et à J3-4 (CS J3-4) et chez les volontaires sains (VS)

Les résultats sont représentés par la moyenne et l'écart-type. Le test non paramétrique de Mann - Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs des différents groupes.

3.4. CD₁₂₇ SOLUBLE

3.4.1. Choc septique *versus* volontaire sain

Le CD₁₂₇ soluble (sCD₁₂₇) a été mesuré chez 33 patients en CS et 16 VS. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les patients atteints de CS et les VS, et ce quel que soit le temps du suivi. Nous avons cependant observé une légère augmentation non significative de sCD₁₂₇ à J1-2 chez les patients (*p* = 0,08), suivie d'un retour à la normale à J3-4 (*p* = 0,76). En effet, les patients présentaient une diminution significative de la concentration en sCD₁₂₇ entre J1-2 et J3-4 (*p* < 0,0001). Les résultats sont représentés dans la Figure 37.

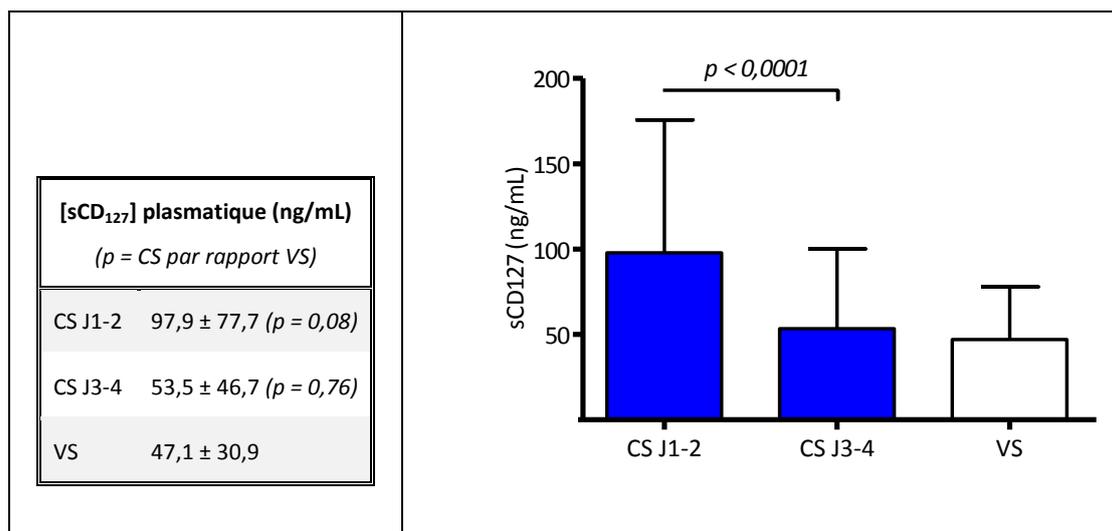


Figure 37 : Concentrations plasmatiques de sCD₁₂₇ en ng / mL chez les patients atteints de CS à J1-2 (CS J1-2) et à J3-4 (CS J3-4) et chez les volontaires sains (VS)

Les résultats sont représentés par la moyenne et l'écart-type. Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour comparer l'évolution des valeurs au cours du temps.

3.4.2. sCD₁₂₇ et infection nosocomiale

Parmi les 33 patients ayant eu un dosage de sCD₁₂₇, 5 patients (soit 15 %) ont développé une IN. Les patients qui ont développé une IN avaient une concentration plasmatique en sCD₁₂₇ plus élevée que les VS, tandis qu'aucune différence significative n'a été observée entre les patients ne développant pas d'IN et les VS. Après comparaison des deux groupes de patients, la concentration en sCD₁₂₇ est apparue significativement plus élevée chez les patients développant une IN par rapport aux patients n'en développant pas, et ce dès J1-2 après le début du choc (*p = 0,017* à J1-2 et *p = 0,008* à J3-4). Les résultats sont représentés dans la Figure 38.

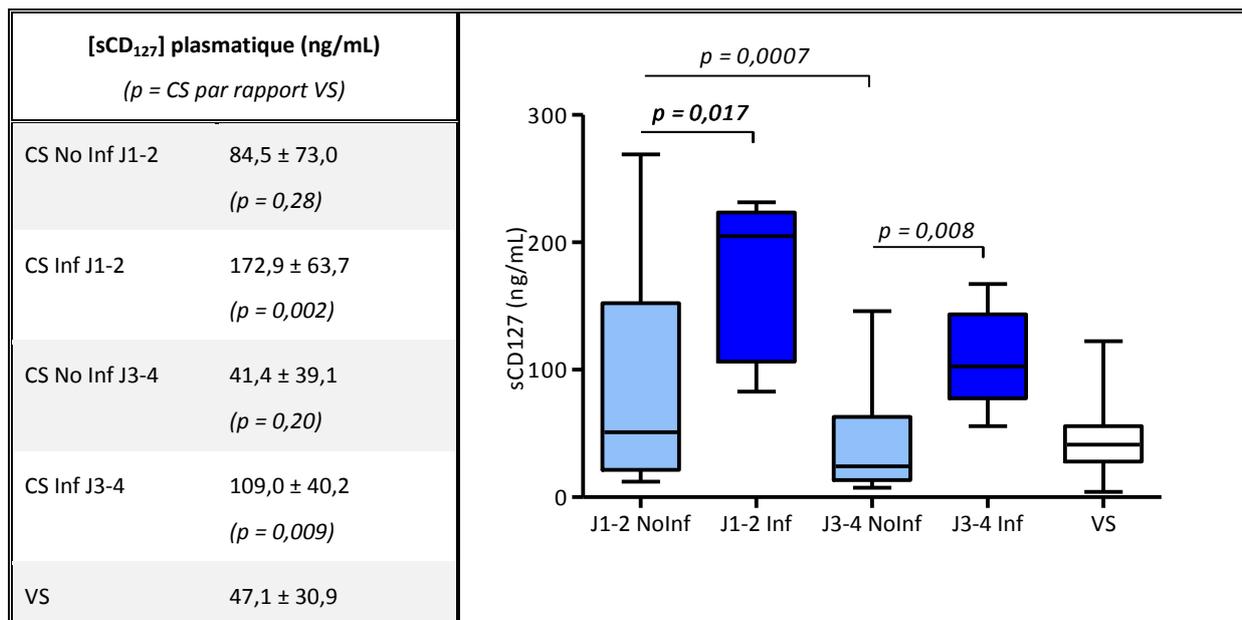


Figure 38 : Concentrations plasmatiques de sCD₁₂₇ en ng / mL chez les patients atteints de CS à J1-2 et à J3-4 et chez les volontaires sains (VS), en tenant compte de la survenue ou non d'IN.

Les résultats sont représentés par des boîtes à moustache. Le test non paramétrique de Mann - Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs entre les groupes. Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour comparer l'évolution des valeurs au cours du temps. IN = Infection nosocomiale, NoInf = absence d'IN et Inf = patient développant une IN

3.4.3. sCD₁₂₇ et mortalité

Parmi les 33 patients ayant eu un dosage de sCD₁₂₇, 13 patients sont décédés (soit 39 % de mortalité). Seule la population de patients non survivants à J1-2 avait une concentration plus élevée en sCD₁₂₇ par rapport aux VS. Les autres groupes de patients (non survivants à J3-4 et survivants) avaient des concentrations de sCD₁₂₇ non significativement différentes de celles des VS.

Au sein d'un même groupe de patient, les concentrations de sCD₁₂₇ ont diminué significativement entre J1-2 et J3-4 ("survivants" (p = 0,002) et "non survivants" (p = 0,02)). Enfin, aucune différence de concentration en sCD₁₂₇ n'a été observée entre les groupes "survivants" et "non survivants", tant à J1-2 (p = 0,33) qu'à J3-4 (p = 0,16). Les résultats sont représentés dans la Figure 39.

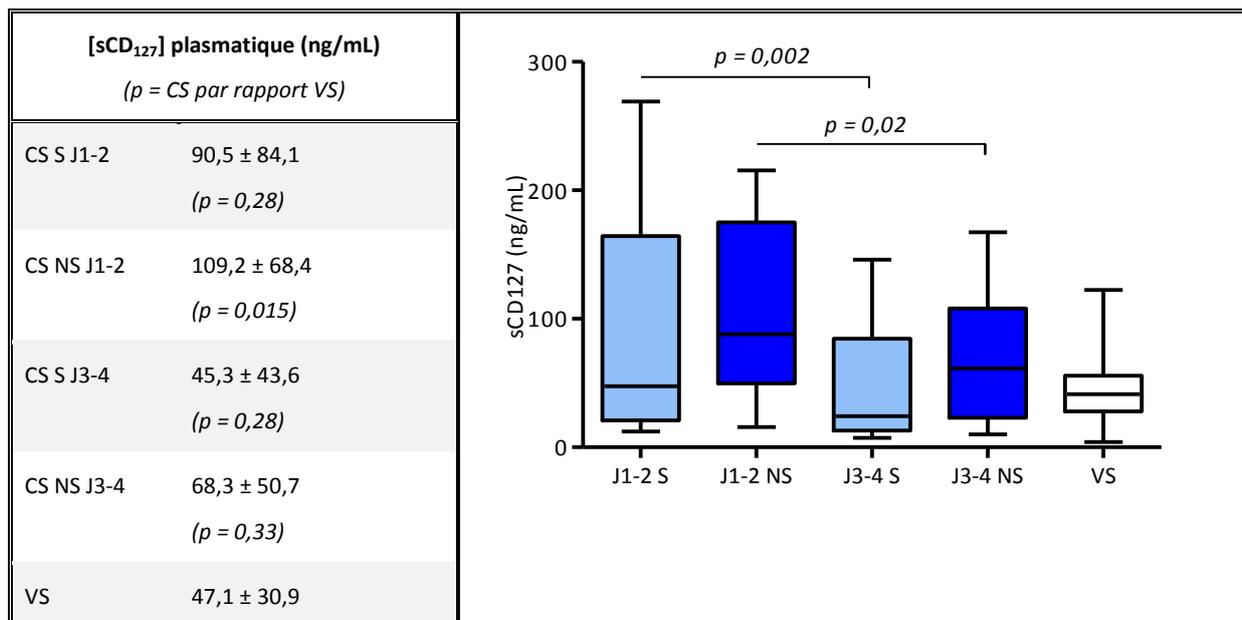


Figure 39 : Concentrations plasmatiques de sCD₁₂₇ en ng/mL chez les patients atteints de CS à J1-2 et à J3-4 et chez les volontaires sains (VS), en tenant compte de la mortalité.

Les résultats sont représentés par des boîtes à moustache. Le test non paramétrique de Mann - Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs entre les groupes. Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour comparer l'évolution des valeurs au cours du temps. S = patient survivant et NS = patient non survivant.

3.4.4. Corrélations entre les concentrations plasmatiques de sCD₁₂₇ et les L_TCD₄

A J1-2, nous avons mis en évidence une faible corrélation inverse entre la concentration en sCD₁₂₇ et la numération des L_TCD₄ chez nos patients ($p = 0,03$; $n = 33$). Cette corrélation était plus marquée à J3-4 ($p = 0,0004$; $n = 28$). Elles sont représentées dans la Figure 40.

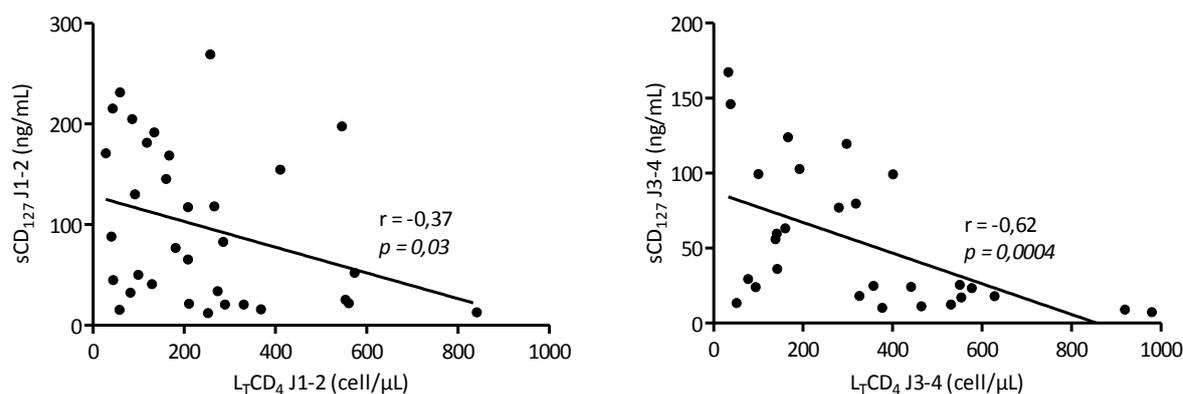


Figure 40 : Corrélations entre la concentration plasmatique de sCD₁₂₇ en ng/mL et le nombre de L_TCD₄ en cellules/μL à J1-2 et à J3-4.

Le test non paramétrique de Spearman a été utilisé.

3.5. PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE

La prolifération lymphocytaire *ex vivo* a été mesurée à partir de cellule purifiées chez 10 patients atteints de CS à J3-4 et chez 10 VS en parallèle. La réponse proliférative lymphocytaire selon différentes conditions a été normalisée par rapport à la réponse mesurée dans le puits de contrôle contenant uniquement du milieu de culture (RPMI).

La stimulation seule par de l'IL-7rh n'a pas eu d'effet sur la prolifération lymphocytaire, que ce soit chez les patients atteints de CS ou chez les VS. L'activation du TCR semble donc nécessaire à l'action de l'IL-7. La stimulation seule du TCR par des billes agonistes anti-CD₂CD₃CD₂₈ a entraîné une prolifération plus importante chez les VS (35,1 ± 26,2) que chez les patients en CS (18,6 ± 27,2 ; $p = 0,02$). Ceci correspond au phénomène d'anergie lymphocytaire classiquement décrit chez les patients en CS [42, 52, 58].

L'ajout d'IL-7rh à une stimulation du TCR a entraîné une augmentation de la prolifération lymphocytaire chez les patients en CS (28,7 ± 36,0 ; $p = 0,006$ versus stimulation TCR seule) ainsi que chez les VS (47,9 ± 32,6 ; $p = 0,004$ versus stimulation TCR seule). Lorsque nous avons comparé la réponse proliférative des patients en CS et des VS à une stimulation du TCR en présence d'IL-7rh, nous n'avons plus observé de différence significative entre les deux groupes ($p = 0,11$) : la présence d'IL-7rh a donc permis de restaurer les capacités prolifératives des patients au même niveau que celles des VS. Les résultats sont représentés dans la Figure 41.

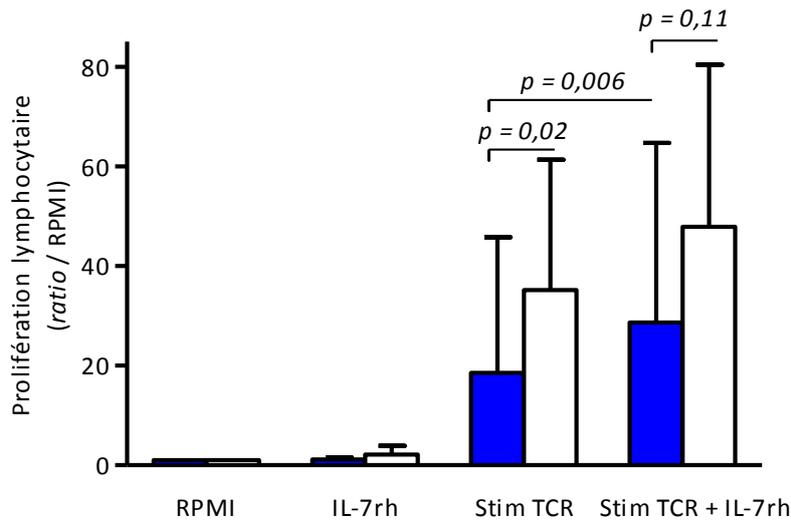


Figure 41 : Réponse proliférative lymphocytaire des patients atteints de choc septique (noir) et des volontaires sains (blanc) selon différentes conditions.

Les résultats sont exprimés en *ratio* de prolifération par rapport au puits de contrôle (RPMI = puits de contrôle contenant du milieu de culture, IL-7rh = IL-7 recombinante humaine, Stim TCR = Stimulation T par des billes agonistes anti-CD₃CD₂₈). Les résultats sont représentés par la moyenne et l'écart-type. Le test non paramétrique de Mann - Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs entre les groupes. Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour comparer la prolifération au sein d'un même groupe, selon les différentes conditions.

Nous avons ensuite considéré le *ratio* de la réponse lymphocytaire à une stimulation T en présence ou en l'absence d'IL-7rh. Nous avons mis en évidence un *ratio* plus important chez les patients en CS ($2,1 \pm 0,9$) par rapport aux VS ($1,4 \pm 0,5$; $p = 0,04$). Ce *ratio* correspond à la récupération des capacités prolifératives liée à la présence d'IL-7rh. Cette récupération était meilleure chez les patients atteints de CS que chez les VS. Les résultats sont représentés dans la Figure 42.

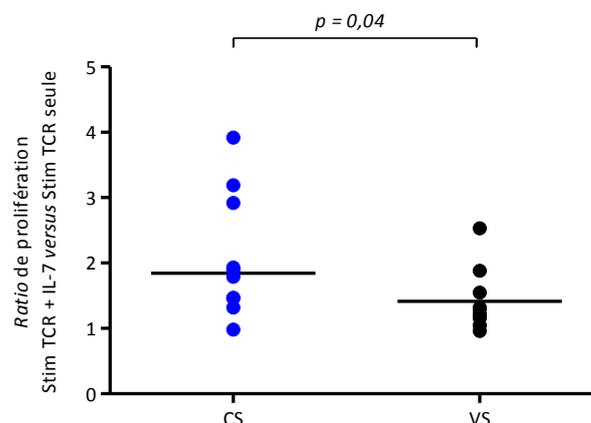


Figure 42 : Comparaison du *ratio* de prolifération en réponse à une stimulation du TCR en présence ou en l'absence d'IL-7rh.

Les résultats sont représentés par la médiane et la dispersion des points. CS : choc septique, VS : volontaire sain

4. DISCUSSION

Les dysfonctions lymphocytaires présentes chez les patients septiques sont illustrées par le développement d'IN ou la survenue de réactivations virales normalement retrouvées chez des patients immunodéprimés. Elles sont par ailleurs associées à un mauvais pronostic chez les patients en CS. Ces dysfonctions lymphocytaires sont très similaires à celles observées chez les patients infectés par le VIH, or l'IL-7 fait actuellement l'objet d'essais cliniques dans cette pathologie dans le but de restaurer les fonctions lymphocytaires des patients. A ce jour, l'IL-7rh a été très bien tolérée dans tous les essais cliniques, induisant seulement quelques effets indésirables mineurs de type éruptions cutanées. Les patients traités par l'IL-7rh ont présenté une augmentation de la numération des L_TCD_4 et des L_TCD_8 circulants, une diversification de leur répertoire T et pour certains, une diminution du pourcentage de L_T régulateurs.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que l'IL-7rh pourrait représenter une thérapie innovante chez les patients en CS, de par ses propriétés de restauration des fonctions lymphocytaires. Nous avons donc tout d'abord étudié les paramètres de la voie de signalisation de l'IL-7 et du CD_{127} chez les patients atteints de CS. Dans un second temps, nous avons réalisé des techniques fonctionnelles visant à tester *ex vivo* les capacités prolifératives de l'IL-7rh.

4.1. APPROCHE OBSERVATIONNELLE

4.1.1. IL-7 plasmatique

Les concentrations plasmatiques d'IL-7 sont significativement plus élevées chez les patients atteints de CS que chez les VS. Cependant, les concentrations d'IL-7 restent basses, inférieures à 13 pg/mL, ce qui est à peine plus élevé que les valeurs de sujets sains publiées par ailleurs (0,3 à 8,4 pg/mL [74-76]). De plus, des corrélations inverses entre l'IL-7 et le nombre de L_TCD_4 ont été rapportées dans certaines études [74], et notamment chez les patients infectés par le VIH [100, 101]. En effet, selon Mazzucchelli, le niveau plasmatique d'IL-7 serait lié à sa consommation par les L_T : plus le nombre de L_T est faible et moins l'IL-7 serait utilisée, ce qui conduirait à une augmentation de sa disponibilité au niveau plasmatique [82].

Il n'est donc pas surprenant d'observer une légère augmentation d'IL-7 chez nos patients en CS, qui présentent tous une lymphopénie (*i.e.* $353 \pm 218 L_TCD_4 / \mu L$). Toutefois, les valeurs retrouvées ici semblent trop faibles par rapport à l'étendue de la lymphopénie retrouvée chez nos patients. En effet, selon Lundström *et al.*, des concentrations en IL-7 de 60 pg/mL peuvent être observées lors

d'une lymphopénie [74]. D'autre part, nous mettons en évidence chez nos patients une faible corrélation positive entre le niveau plasmatique d'IL-7 et la numération des L_TCD_4 . Ces résultats sont contradictoires vis-à-vis de l'hypothèse de Mazzucchelli, qui prône une corrélation inverse entre l'IL-7 et le nombre de Ly [82]. Dans les modèles animaux, l'augmentation de l'IL-7 plasmatique en réponse à une lymphopénie semble jouer un rôle prépondérant pour la récupération des fonctions lymphocytaires [74]. Ici, l'augmentation trop faible d'IL-7 chez nos patients pourrait partiellement contribuer à l'anergie lymphocytaire.

Lorsque l'on considère la survenue d'IN ou le décès du patient, aucune différence de concentration plasmatique d'IL-7 n'est observée entre les groupes "infectés" et "non infectés" d'une part, et " survivant " et " non survivant " d'autre part. La mesure de l'IL-7 plasmatique chez les patients ne semble pas être un bon biomarqueur pour la prédiction de la mortalité ou de la survenue d'IN. En effet, les très faibles concentrations que nous mesurons (de l'ordre du pg/mL) rendent très difficile la stratification des patients.

Cependant, lorsque l'on compare les patients et les VS, on remarque que les concentrations d'IL-7 des patients développant une IN restent au même niveau que celles des VS tandis que les patients n'en développant pas ont une concentration en IL-7 significativement plus élevée. Il semblerait donc chez les patients en CS, qu'une concentration plasmatique d'IL-7 élevée entraînerait une protection contre la survenue d'IN. Carrol, dans une lettre à l'éditeur publiée en 2010, a montré, sur une cohorte de 155 enfants atteints de sepsis, que la concentration d'IL-7 était plus élevée chez les survivants par rapport aux non survivants [102]. L'ensemble de ces observations concorde avec le fait qu'une augmentation d'IL-7 en réponse à une lymphopénie est primordiale pour la récupération des fonctions lymphocytaires [74].

4.1.2. Expression lymphocytaire du CD_{127} et CD_{127} soluble

4.1.2.1. Expression lymphocytaire du CD_{127}

D'après les données de la littérature, les seules cellules matures exprimant le CD_{127} sont les L_T [82, 83]. Nous avons confirmé cette hypothèse en regardant l'expression de la molécule CD_3 , qui est un marqueur de la lignée T, sur les Ly exprimant le CD_{127} : tous les Ly exprimant CD_{127} expriment aussi le CD_3 , il s'agit donc bien de L_T matures.

D'autre part, une diminution de l'expression du CD_{127} est observée sur les L_T de patients infectés par le VIH, et plus particulièrement sur les L_TCD_8 [100, 103, 104]. Cette diminution d'expression étant susceptible d'entraîner une inefficacité d'un traitement par l'IL-7, nous avons voulu vérifier, chez les

sujets atteints de CS, l'absence d'altération de l'expression du CD₁₂₇ sur les L_TCD₄ d'une part et sur les L_TCD₈ d'autre part.

Chez les patients atteints de CS, nous n'observons pas de différence significative d'expression du CD₁₂₇ sur les L_TCD₄ par rapport aux VS, quel que soit le temps du suivi. On remarque cependant une légère diminution chez les patients entre J1-2 et J3-4, mais qui reste au même niveau que les VS.

Lorsque l'on étudie les IMF du CD₁₂₇ sur les L_TCD₈, les patients en CS ont une IMF légèrement plus basse à J3-4 que les témoins, tandis qu'aucune différence n'est observée à J1-2. Les pourcentages de L_TCD₈ exprimant le CD₁₂₇ ne sont cependant pas différents entre les CS et les VS, quel que soit le temps du suivi.

Ceci implique que l'expression du CD₁₂₇ est relativement conservée sur les L_TCD₄ et les L_TCD₈ de patients atteints de CS, ce qui les rend susceptibles de répondre à une stimulation par de l'IL-7rh.

L'équipe de R. Hotchkiss a évalué la voie de signalisation de l'IL-7 chez des souris septiques. Elle a rapporté une augmentation de l'expression du CD₁₂₇ sur les L_TCD₄ et les L_TCD₈. Les auteurs ont associé cette augmentation d'expression au maintien de l'homéostasie de la voie de l'IL-7 en réponse à la diminution plasmatique du nombre de L_TCD₄ et L_TCD₈. Dans cette étude, l'augmentation d'expression du CD₁₂₇ est d'ailleurs associée à une augmentation des concentrations plasmatiques d'IL-7 dans le but de restaurer la prolifération [96].

4.1.2.2. CD₁₂₇ soluble

Chez les patients à J1-2, le sCD₁₂₇ est légèrement plus élevé que chez les VS, mais de façon non significative. On observe ensuite une diminution des concentrations à J3-4, où elles sont comparables à celles des VS. Ces résultats sont discordants par rapport à ceux obtenus dans une étude de patients infectés par le VIH, chez qui A. Crawley avait retrouvé des concentrations élevées de sCD₁₂₇. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence le rôle délétère du sCD₁₂₇ vis-à-vis d'un traitement par l'IL-7. En effet, le sCD₁₂₇ entraînerait une altération de la voie de signalisation de l'IL-7, par diminution de la phosphorylation de STAT 5 et d'Akt. Le sCD₁₂₇ est par ailleurs capable d'inhiber l'activité de l'IL-7, notamment par diminution de la prolifération induite par l'IL-7 [98].

Dans notre étude, lorsque l'on compare les patients survivants et les non survivants, les concentrations en sCD₁₂₇ ne sont pas différentes. Cependant, le sCD₁₂₇ semble être un bon marqueur pronostique de la survenue d'IN. En effet, les concentrations en sCD₁₂₇ sont significativement plus élevées chez les patients qui vont développer une IN par rapport aux patients qui n'en développeront pas. Il est à noter que cet aspect de notre travail a fait l'objet d'un dépôt de brevet par les Hôpitaux

de Lyon en 2012. Ceci semble être en accord avec le rôle délétère du sCD₁₂₇ décrit par Crawley *et al.* [98]. Nous pouvons donc imaginer que plus la concentration en sCD₁₂₇ est élevée, plus l'action de l'IL-7 est inhibée, et donc plus les fonctions lymphocytaires sont altérées. La corrélation inverse que nous retrouvons entre les concentrations de sCD₁₂₇ et la numération des L_TCD₄ chez nos patients vient conforter cette hypothèse.

Il est par ailleurs démontré que l'étendue de l'anergie lymphocytaire est corrélée à la mortalité et à la survenue d'IN [42]. Selon cette hypothèse, les patients non survivants devraient également avoir une concentration en sCD₁₂₇ plus élevée que les patients survivants, ce qui n'est pas le cas ici. Le sCD₁₂₇ n'est sans doute pas le seul facteur à prendre en compte dans une pathologie aussi complexe que le CS. Il serait somme toute intéressant de mesurer le sCD₁₂₇ sur une cohorte de patients plus importante afin de compléter nos résultats. D'autre part, la date de survenue du décès serait intéressante à prendre en compte afin de voir si l'on observe des différences selon si le patient décède de façon précoce ou plus tardivement, dans les suites de l'immunosuppression.

4.1.3. Conclusion

Les premiers paramètres étudiés chez les patients atteints de CS ont montré une concentration plasmatique en IL-7 et en sCD₁₂₇ peu augmentées et une expression lymphocytaire du CD₁₂₇ conservée. Au vu de ces résultats, l'IL-7rh pourrait donc être efficace et restaurer les fonctions lymphocytaires chez les patients atteints de CS.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons ensuite, au travers d'une approche fonctionnelle, testé *ex vivo* les capacités lymphoprolifératives de l'IL-7rh vis à vis des cellules des patients.

L'approche observationnelle de notre travail fait partie d'une étude plus globale évaluant la fonctionnalité de la voie de signalisation de l'IL-7 chez les patients atteints de CS. L'ensemble de ce travail a été accepté pour publication dans *Journal of Immunology*, sous réserve de corrections mineures.

4.2. APPROCHE FONCTIONNELLE

4.2.1. Prolifération lymphocytaire restaurée par l'IL-7rh

Nous avons étudié la signalisation de l'IL-7 selon une approche fonctionnelle par réalisation de tests de prolifération lymphocytaire chez les patients atteints de CS en absence et en présence d'IL-7rh.

Les patients atteints de CS présentent une altération de la prolifération lymphocytaire, correspondant au phénomène d'anergie lymphocytaire classiquement décrit [42, 52, 58]. L'IL-7rh permet de restaurer la prolifération lymphocytaire chez les patients.

Les résultats que nous obtenons sont complémentaires de ceux retrouvés sur des modèles murins de péritonite. Dans plusieurs études, le traitement des souris septiques par l'IL-7rh a abouti à une augmentation des L_TCD_4 et des L_TCD_8 au niveau des organes lymphoïdes secondaires, par diminution de l'apoptose, mise en évidence par une augmentation de l'expression intracellulaire de Bcl-2. Les auteurs ont également rapporté une augmentation de la prolifération des L_TCD_4 et des L_TCD_8 et une restauration de la production d'IFN- γ suite à l'administration d'IL-7 [66, 96, 97, 105]. Par ailleurs, l'IL-7, *via* l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et des intégrines contribue à un accroissement du recrutement des cellules au site infectieux. Notamment, l'IL-7 permet le recrutement rapide de $L_T \gamma\delta$ qui vont accélérer la mobilisation des PN au niveau du site de l'infection [66, 96, 97].

Toutes ces études ont montré une amélioration de la survie des souris septiques par l'IL-7rh. Ceci est très en faveur de l'utilisation de l'IL-7rh chez les patients atteints de CS. En effet, même s'il n'est pas surprenant d'observer les effets bénéfiques de l'IL-7rh sur les dysfonctions de l'immunité adaptative, ses effets sur le système immunitaire inné sont tout aussi intéressants et prometteurs pour son utilisation en clinique [66, 96, 97, 105].

Les premiers résultats obtenus dans les essais cliniques sont très favorables à l'utilisation de l'IL-7rh chez les patients atteints de CS. En effet, la plupart des essais sont réalisés chez des patients infectés par le VIH ou atteints de cancer, et présentant de nombreuses dysfonctions lymphocytaires (*e.g.* diminution des L_TCD_4 , anergie lymphocytaire, augmentation des L_T régulateurs, altérations phénotypiques, *etc.*) comparables à celles observées chez les patients atteints de CS. Dans ces essais, l'IL-7rh a permis de restaurer les fonctions lymphocytaires chez les patients. Son administration a notamment conduit à une augmentation de la numération des L_TCD_4 et des L_TCD_8 , par diminution d'apoptose (mise en évidence par augmentation du marqueur Bcl-2) et par augmentation de la prolifération (augmentation du pourcentage de cellules exprimant Ki-67). Elle a également permis une restauration de la diversité du répertoire du TCR et une diminution des L_T régulateurs [74, 91, 94, 95].

4.3. CONCLUSION

Avant d'envisager l'utilisation de l'IL-7rh chez les patients septiques, nous pourrions compléter notre approche fonctionnelle par l'étude de marqueurs de la signalisation de l'IL-7 afin de mieux comprendre par quelle voie cette molécule exerce son action. L'expression des marqueurs STAT 5, Akt, Bcl-2 et Ki-67 au niveau lymphocytaire après prolifération avec de l'IL-7rh serait intéressante à évaluer afin de voir si l'on retrouve les mêmes résultats que sur les modèles murins et *in vivo*, dans les autres pathologies (VIH, cancer, *etc.*). Nous pourrions également mesurer la production d'IFN- γ par les L_TCD₈ avant et après incubation avec de l'IL-7rh afin de voir si celle-ci est capable de la restaurer chez les patients en CS. La restauration de la diversité du répertoire du TCR par l'IL-7rh *ex vivo* semble difficile à mettre en œuvre. En effet, les organes lymphoïdes secondaires sont nécessaires à la diversification du répertoire.

Si cette approche fonctionnelle plus complète nous offre de bons résultats, nous pourrions alors envisager la mise en place d'un essai clinique avec l'IL-7rh chez les patients en CS.

5. CONCLUSIONS

Les syndromes septiques représentent la première cause de mortalité des patients en réanimation. Ils sont caractérisés par la survenue d'une profonde immunosuppression. L'amplitude et la persistance dans le temps de cette dernière sont corrélées à un risque accru d'IN et à une mortalité plus élevée. Les thérapies immunostimulantes sont maintenant considérées dans les syndromes septiques comme potentiel traitement adjuvant et les premiers essais cliniques donnent des résultats prometteurs. Parmi les molécules candidates, l'IL-7 s'est montrée efficace dans d'autres situations cliniques (*i.e.* syndrome d'immunodéficience acquise, oncologie) où les dysfonctions lymphocytaires sont comparables à celles observées chez les patients septiques. Par ailleurs, son efficacité a été démontrée dans différents modèles animaux de péritonite.

Avant d'envisager l'utilisation clinique de l'IL-7 dans les états septiques, l'objectif de notre travail était d'évaluer la voie de signalisation de l'IL-7 *via* le CD₁₂₇ chez les patients en CS et de mesurer son effet *ex vivo* sur la restauration de la prolifération lymphocytaire.

55 patients atteints de CS ont été inclus dans l'étude. Leurs résultats ont été comparés à ceux obtenus chez des VS. Nous avons tout d'abord étudié l'expression du CD₁₂₇ au niveau lymphocytaire T (L_T) par cytométrie en flux, puis mesuré sa forme soluble par ELISA. Nous avons ensuite dosé l'IL-7 plasmatique par technique Luminex. Enfin, nous avons réalisé des tests de prolifération lymphocytaire par la technique d'incorporation de thymidine tritiée.

Nous avons montré que l'expression du CD₁₂₇, partie active du récepteur de l'IL-7, est conservée chez les patients en choc septique, sur les sous-populations lymphocytaires l'exprimant habituellement (L_TCD₄ et L_TCD₈). Par ailleurs, les patients septiques ne présentent pas d'augmentation de la forme soluble du CD₁₂₇, inhibiteur potentiel du traitement par l'IL-7 et les concentrations plasmatiques d'IL-7 chez les patients sont, de plus, très peu augmentées par rapport à celles des volontaires sains. La voie d'activation de l'IL-7 *via* le CD₁₂₇ serait donc potentiellement activable par un apport exogène d'IL-7 recombinante chez les patients septiques. A cet effet, nous avons testé les capacités immunostimulantes de l'IL-7 *ex vivo* sur la prolifération lymphocytaire. La stimulation non spécifique (*i.e.* réponse à un mitogène) des lymphocytes a mis en évidence un défaut de prolifération des patients par rapport aux volontaires sains, témoignant d'une anergie lymphocytaire. L'ajout d'IL-7 *ex vivo* a entraîné une augmentation significative de la prolifération lymphocytaire, ramenant la prolifération des deux groupes au même niveau.

Cette étude préclinique a donc permis de montrer que la voie de signalisation de l'IL-7 reste fonctionnelle au cours des états septiques. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour évaluer le signal intracellulaire lié à l'activation du CD₁₂₇ par l'IL-7 (phosphorylation de STAT5, expression de Bcl-2) et pour explorer d'autres aspects fonctionnels (production d'interféron gamma par les L_TCD₈). En cas de résultats positifs, il sera raisonnable d'envisager un essai clinique utilisant l'IL-7 recombinante chez les patients septiques les plus gravement immunodéprimés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bone, R.C., W.J. Sibbald, and C.L. Sprung, *The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure*. Chest, 1992. **101**(6): p. 1481-3.
2. Levy, M.M., et al., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Crit Care Med, 2003. **31**(4): p. 1250-6.
3. Martin, G., et al., *The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa (activated) use and patient outcomes*. Crit Care, 2009. **13**(3): p. R103.
4. Brun-Buisson, C., et al., *EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units*. Intensive Care Med, 2004. **30**(4): p. 580-8.
5. Lever, A. and I. Mackenzie, *Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis*. BMJ, 2007. **335**(7625): p. 879-83.
6. Wenzel, R.P., *Treating sepsis*. N Engl J Med, 2002. **347**(13): p. 966-7.
7. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1546-54.
8. Burchardi, H. and H. Schneider, *Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy*. Pharmacoeconomics, 2004. **22**(12): p. 793-813.
9. Brun-Buisson, C., et al., *The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis*. Intensive Care Med, 2003. **29**(9): p. 1464-71.
10. Adrie, C., 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, 2005. **20**(1): p. 46-58.
11. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1303-10.
12. Vincent, J.L., et al., *Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study*. Crit Care Med, 2006. **34**(2): p. 344-53.
13. Dombrovskiy, V.Y., et al., *Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003*. Crit Care Med, 2007. **35**(5): p. 1244-50.
14. Vincent, J.L., et al., *International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units*. JAMA, 2009. **302**(21): p. 2323-9.
15. Opal, S.M., *New perspectives on immunomodulatory therapy for bacteraemia and sepsis*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **36**(2): p. S70-S73.
16. Stearns-Kurosawa, D.J., et al., *The Pathogenesis of Sepsis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 19-48.
17. Annane, D., E. Bellissant, and J.M. Cavillon, *Septic shock*. Lancet, 2005. **365**(9453): p. 63-78.
18. Zhu, J. and C. Mohan, *Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 781235.
19. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
20. Cinel, I. and S.M. Opal, *Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer*. Crit Care Med, 2009. **37**(1): p. 291-304.

21. Vincent, J.L. and E. Abraham, *The last 100 years of sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(3): p. 256-63.
22. Boomer, J.S., et al., *A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis*. Crit Care, 2012. **16**(3): p. R112.
23. Brealey, D., et al., *Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 219-23.
24. Vincent, J.L., et al., *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine*. Intensive Care Med, 1996. **22**(7): p. 707-10.
25. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008*. Crit Care Med, 2008. **36**(1): p. 296-327.
26. Rivers, E., et al., *Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1368-77.
27. Kumar, A., et al., *Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. Crit Care Med, 2006. **34**(6): p. 1589-96.
28. Annane, D., et al., *Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock*. Jama, 2002. **288**(7): p. 862-71.
29. Sprung, C.L., et al., *Hydrocortisone therapy for patients with septic shock*. N Engl J Med, 2008. **358**(2): p. 111-24.
30. Moreno, R., et al., *Time course of organ failure in patients with septic shock treated with hydrocortisone: results of the Corticus study*. Intensive Care Med, 2011. **37**(11): p. 1765-72.
31. Rimmele, T. and J.A. Kellum, *High-volume hemofiltration in the intensive care unit: a blood purification therapy*. Anesthesiology, 2012. **116**(6): p. 1377-87.
32. Tapia, P., et al., *Effectiveness of short-term 6-hour high-volume hemofiltration during refractory severe septic shock*. J Trauma Acute Care Surg, 2012. **72**(5): p. 1228-1238.
33. Ranieri, V.M., et al., *Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock*. N Engl J Med, 2012. **366**(22): p. 2055-64.
34. Reinhart, K. and W. Karzai, *Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned*. Crit Care Med, 2001. **29**(7 Suppl): p. S121-5.
35. Opal, S.M., et al., *Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group*. Crit Care Med, 1997. **25**(7): p. 1115-24.
36. Fisher, C.J., Jr., et al., *Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group*. JAMA, 1994. **271**(23): p. 1836-43.
37. Wittebole, X., D. Castanares-Zapatero, and P.F. Laterre, *Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 568396.
38. Tidswell, M., et al., *Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis*. Crit Care Med, 2010. **38**(1): p. 72-83.
39. Angus, D.C., *The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board?* JAMA, 2011. **306**(23): p. 2614-5.

40. Cavaillon, J.M. and M. Adib-Conquy, *Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis*. Crit Care, 2006. **10**(5): p. 233.
41. Biswas, S.K. and E. Lopez-Collazo, *Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance*. Trends Immunol, 2009. **30**(10): p. 475-87.
42. Monneret, G., et al., *Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony*. Mol Med, 2008. **14**(1-2): p. 64-78.
43. Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson, *Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 813-22.
44. Boomer, J.S., et al., *Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure*. JAMA, 2011. **306**(23): p. 2594-605.
45. Unsinger, J., et al., *The role of TCR engagement and activation-induced cell death in sepsis-induced T cell apoptosis*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7968-73.
46. Sternberg, E.M., *Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 318-28.
47. Carson, W.F., et al., *Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression*. Epigenetics, 2011. **6**(3): p. 273-83.
48. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
49. Adib-Conquy, M. and J.M. Cavaillon, *Compensatory anti-inflammatory response syndrome*. Thromb Haemost, 2009. **101**(1): p. 36-47.
50. Haveman, J.W., et al., *The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment*. Neth J Med, 1999. **55**(3): p. 132-41.
51. Monneret, G., et al., *Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock*. Intensive Care Med, 2006. **32**(8): p. 1175-83.
52. Manjuck, J., et al., *Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients*. J Lab Clin Med, 2000. **135**(2): p. 153-60.
53. Heininger, A., et al., *Cytomegalovirus reactivation and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis*. Crit Care, 2011. **15**(2): p. R77.
54. Kalil, A.C. and D.F. Florescu, *Is cytomegalovirus reactivation increasing the mortality of patients with severe sepsis?* Crit Care, 2011. **15**(2): p. 138.
55. Venet, F., et al., *Early Assessment of Leukocyte Alterations at Diagnosis of Septic Shock*. Shock, 2010. **34**(4): p. 358-363.
56. Hotchkiss, R.S., et al., *Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 5110-8.
57. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
58. Guignant, C., et al., *Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients*. Crit Care, 2011. **15**(2): p. R99.
59. Venet, F., et al., *Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock*. Crit Care Med, 2005. **33**(12): p. 2836-40.
60. Venet, F., et al., *Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)/CD25 (+)/CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients*. Intensive Care Med, 2009. **35**(4): p. 678-86.

61. Heidecke, C.D., et al., *Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection*. Am J Surg, 1999. **178**(4): p. 288-92.
62. Venet, F., et al., *Decreased T cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study*. Crit Care Med, 2012: p. In press.
63. Hotchkiss, R.S., et al., *The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression*. Nat Med, 2009. **15**(5): p. 496-7.
64. Muenzer, J.T., et al., *Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis*. Shock, 2006. **26**(6): p. 565-70.
65. Murphey, E.D., et al., *Diminished bacterial clearance is associated with decreased IL-12 and interferon-gamma production but a sustained proinflammatory response in a murine model of postseptic immunosuppression*. Shock, 2004. **21**(5): p. 415-25.
66. Unsinger, J., et al., *IL-7 Ameliorates Immune Dysfunction and Improves Survival in a Two-Hit Model of Fungal Sepsis*. J Infect Dis, 2012.
67. Hotchkiss, R.S. and S. Opal, *Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe*. N Engl J Med, 2010. **363**(1): p. 87-9.
68. Docke, W.D., et al., *Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment*. Nat Med, 1997. **3**(6): p. 678-81.
69. Meisel, C., et al., *GM-CSF to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression: A Double-blind Randomized Placebo-controlled Multicenter Trial*. Am J Respir Crit Care Med, 2009.
70. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
71. Brahmandam, P., et al., *Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(2): p. 233-40.
72. Inoue, S., et al., *Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis*. Shock, 2011. **36**(1): p. 38-44.
73. Namen, A.E., et al., *B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors*. J Exp Med, 1988. **167**(3): p. 988-1002.
74. Lundstrom, W., N.M. Fewkes, and C.L. Mackall, *IL-7 in human health and disease*. Semin Immunol, 2012. **24**(3): p. 218-24.
75. Fry, T.J., et al., *A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis*. Blood, 2001. **97**(10): p. 2983-90.
76. Bolotin, E., et al., *Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(8): p. 783-8.
77. McElroy, C.A., J.A. Dohm, and S.T. Walsh, *Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7Ralpha complex*. Structure, 2009. **17**(1): p. 54-65.
78. Sasson, S.C., J.J. Zaunders, and A.D. Kelleher, *The IL-7/IL-7 receptor axis: understanding its central role in T-cell homeostasis and the challenges facing its utilization as a novel therapy*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(12): p. 1571-82.
79. Lynch, M., et al., *The interleukin-7 receptor gene is at 5p13*. Hum Genet, 1992. **89**(5): p. 566-8.
80. Foxwell, B.M., K. Barrett, and M. Feldmann, *Cytokine receptors: structure and signal transduction*. Clin Exp Immunol, 1992. **90**(2): p. 161-9.

81. Jiang, Q., et al., *Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(4-5): p. 513-33.
82. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 144-54.
83. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Interleukin-7: from bench to clinic*. Blood, 2002. **99**(11): p. 3892-904.
84. Mackall, C.L., T.J. Fry, and R.E. Gress, *Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(5): p. 330-42.
85. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
86. Reche, P.A., et al., *Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 336-43.
87. Kittipatarin, C. and A.R. Khaled, *Interlinking interleukin-7*. Cytokine, 2007. **39**(1): p. 75-83.
88. Puel, A., et al., *Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency*. Nat Genet, 1998. **20**(4): p. 394-7.
89. Hong, C., M.A. Luckey, and J.H. Park, *Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development*. Semin Immunol, 2012. **24**(3): p. 151-8.
90. Sportes, C., et al., *Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1701-14.
91. Morre, M. and S. Beq, *Interleukin-7 and immune reconstitution in cancer patients: a new paradigm for dramatically increasing overall survival*. Target Oncol, 2012. **7**(1): p. 55-68.
92. Ceredig, R. and A.G. Rolink, *The key role of IL-7 in lymphopoiesis*. Semin Immunol, 2012. **24**(3): p. 159-64.
93. Corfe, S.A. and C.J. Paige, *The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation*. Semin Immunol, 2012. **24**(3): p. 198-208.
94. Levy, Y., et al., *Effects of Recombinant Human Interleukin 7 on T-Cell Recovery and Thymic Output in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy: Results of a Phase I/IIa Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Study*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(2): p. 291-300.
95. Sportes, C., R.E. Gress, and C.L. Mackall, *Perspective on potential clinical applications of recombinant human interleukin-7*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1182**: p. 28-38.
96. Unsinger J, M.M., Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, McDonough JS, Tschoep J, Ferguson TA, McDunn JE, Morre M, Hildeman DA, Caldwell CC, Hotchkiss RS., *IL-7 Promotes T Cell Viability, Trafficking, and Functionality and Improves Survival in Sepsis*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3768-79.
97. Kasten, K.R., et al., *Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis*. Infect Immun, 2010. **78**(11): p. 4714-22.
98. Crawley, A.M., S. Faucher, and J.B. Angel, *Soluble IL-7R alpha (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4679-87.
99. Janot-Sardet, C., et al., *A validated assay to measure soluble IL-7 receptor shows minimal impact of IL-7 treatment*. J Immunol Methods, 2010. **353**(1-2): p. 115-23.

100. Benito, J.M., et al., *Down-regulation of interleukin-7 receptor (CD127) in HIV infection is associated with T cell activation and is a main factor influencing restoration of CD4(+) cells after antiretroviral therapy.* J Infect Dis, 2008. **198**(10): p. 1466-73.
101. Napolitano, L.A., et al., *Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis.* Nat Med, 2001. **7**(1): p. 73-9.
102. Carrol, E.D., *Comment on "IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis" and comment on "IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis".* J Immunol, 2010. **15**(185): p. 789-90.
103. Colle, J.H., et al., *CD127 expression and regulation are altered in the memory CD8 T cells of HIV-infected patients--reversal by highly active anti-retroviral therapy (HAART).* Clin Exp Immunol, 2006. **143**(3): p. 398-403.
104. Vranjkovic, A., et al., *IL-7 decreases IL-7 receptor alpha (CD127) expression and induces the shedding of CD127 by human CD8+ T cells.* Int Immunol, 2007. **19**(12): p. 1329-39.
105. Unsinger, J., et al., *Differential lymphopenia-induced homeostatic proliferation for CD4+ and CD8+ T cells following septic injury.* J Leukoc Biol, 2009. **85**(3): p. 382-90.

ANNEXE



Hôpitaux de Lyon

Monitoring IL-7 pathway in septic shock patients

Fabienne Venet¹, Astrid Villars-Méchin¹, Anne-Perrine Foray¹, Anne Portier¹, Alain Lepape², Guillaume Monneret¹

¹ Hospices Civils de Lyon - Immunology Department, Hôpital E. Herriot, Lyon, France

² Hospices Civils de Lyon - Intensive Care Unit, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre-Bénite, France

Corresponding author: fabienne.venet@chu-lyon.fr

1- Abstract

Introduction

Septic syndromes, defined by the association of an infection and a systemic inflammatory response syndrome are the leading cause of death in ICU. Dysfunctions of the adaptive immune response have been observed after severe sepsis. In patients, the intensity and duration of these lymphocyte alterations are closely correlated with the occurrence of secondary nosocomial infections (mainly bacterial but also viral and fungal) and mortality.

Recombinant human (rh) IL-7, known for its anti-apoptotic and immunostimulating properties on lymphocytes, represents a good candidate for the restoration of normal lymphocytic functions in sepsis. This molecule is currently tested in phase I and phase II clinical trials in other diseases (oncology, HIV, HCV). Studies in murine models have shown its capacity to reduce mortality and restore normal lymphocyte functions after sepsis. However, the capacity of rhIL-7 to reverse sepsis-induced lymphocyte alterations in septic patients is unknown.

Objectives

Prior to a clinical trial testing rhIL-7 in sepsis, we performed an observational work on IL-7 pathway in septic shock patients.

Methods

A retrospective cohort of 35 septic shock patients for whom plasma samples were stored in a "blood bank" was included (IL-7 and sCD127 concentrations, CD127 expression on CD4⁺ T cells). A prospective cohort of 27 patients was also included (CD127 expression on CD8⁺ T cells and ex vivo proliferation). Circulating IL-7 concentration was measured by multiplex ELISA technique. Concurrently, cellular expression of IL-7 receptor (CD127) was measured by flow cytometry and an ELISA test was developed to monitor its soluble form (sCD127). Finally, ex vivo capacity of rhIL-7 to restore lymphocyte proliferation was assessed.

Results

Plasmatic IL-7 concentrations were increased in septic shock patients in comparison with healthy volunteers. Cellular CD127 expression was not modified in sepsis. An early increased sCD127 concentration was observed in patients that however did not reach statistical significance. Importantly, incubation of patients cells with rhIL-7 was associated with a strong restoration of lymphocyte proliferation.

Conclusion

The persistence of IL-7 receptor expression and most importantly the potent stimulating effect of rhIL-7 on lymphocyte proliferation after sepsis represent encouraging preliminary results for the development of a clinical trial testing rhIL-7 in septic shock patients.

References

Holtchkiss et al Nat Med 2009 - Unsinger et al J Immunol 2010

Grant acknowledgment

GM, FV, and AL are supported by the Hospices Civils de Lyon and Université Claude Bernard Lyon I (EAM 4174 UCBL-HCL). GM is also supported by French ministry of health (PHRC Interregional 2008), FIVNO1 and DGOS-INSERM (Recherche clinique translationnelle 2009).

3- Highlights

- Plasmatic IL-7 concentration is significantly decreased in patients that will develop a secondary infection in comparison with patients that remained free of any nosocomial episode.

- Cellular expression of IL-7 receptor is conserved after septic shock without any difference between survivors and non-survivors or patients with or without nosocomial infection.

- Soluble fraction of IL-7 receptor is slightly increased at the beginning of shock but returns to normal values overtime. A marked increase is observed in patients that present with a nosocomial infection.

- Ex vivo incubation of patients' cells with rhIL-7 is associated with a significantly increased proliferation in comparison with healthy volunteers.

- Recombinant human IL-7 could represent an innovative therapeutic strategy in the treatment of septic shock-induced lymphocyte dysfunctions.

2- Results

- Retrospective study (plasmatic IL-7 & sCD127 concentrations – CD127 expression on CD4⁺ T cells)

- n = 35 septic shock patients sampled at D1-2 and D3-5 after the onset of shock
28-day mortality = 37% - n = 13 non-survivors (NS) and 22 survivors (S). 17% patients acquired a nosocomial infection (n = 6 NI) and 29 patients remained free of nosocomial episode (No NI)

- n = 30 healthy volunteers (HV)

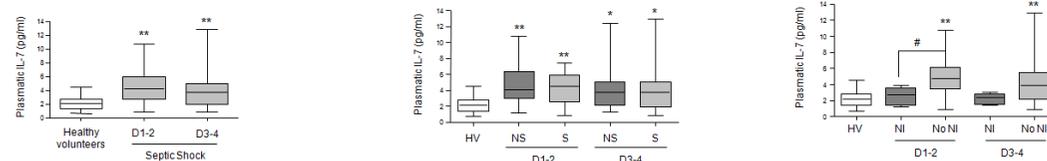
- Prospective study (CD127 expression on CD8⁺ T cells)

- n = 27 septic shock patients & 30 age-matched healthy volunteers

* p<0.05 ** p<0.005 vs Healthy Volunteers' values – Mann Whitney U-test
p<0.05 ## p<0.005 vs No NI values – Mann Whitney U-test

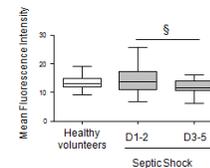
§ p<0.05 §§ p<0.005 – overtime evolution in the same group of patients – Wilcoxon paired t-test

A- Plasmatic IL-7 concentration

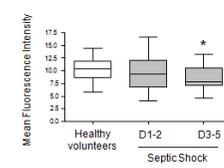


B- Cellular expression of IL-7 receptor-α (CD127)

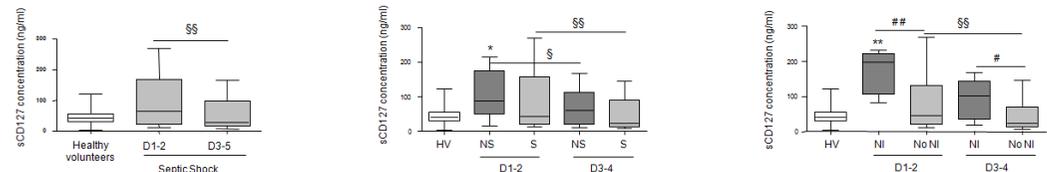
1- On CD4⁺ T cells



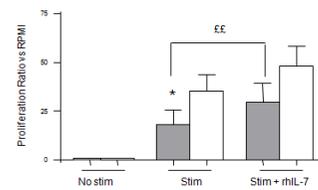
2- On CD8⁺ T cells



C- Plasmatic concentration of soluble IL-7 receptor-α (sCD127)



D- Cell proliferation in response to recombinant human IL-7



EE p<0.005 vs stimulated septic patients cells – Wilcoxon paired t-test

* p<0.05 vs healthy volunteers – Mann Whitney test

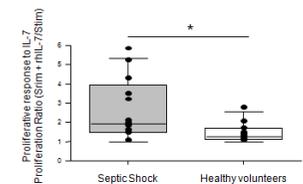
n = 11 septic shock patients at D3-D5 & 10 healthy volunteers

Stimulation = antiCD3-antiCD28-antiCD2 antibodies

rhIL-7 concentration = 100ng/ml

Proliferation was assessed via tritiated thymidine incorporation

■ Septic Shock patients at D3
□ Healthy volunteers



Poster présenté à l'ESICM (European Society of Intensive Care Medicine) à Berlin en 2011 et à la Société Française d'Immunologie (SFI) à Montpellier en 2011

VILLARS-MECHIN Astrid
(CC BY-NC-ND 2.0)

L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.