



<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>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1  
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES  
FACULTE DE PHARMACIE LYON  
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2017

THESE n° 39-2017

**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 Madame le Docteur Fabienne VENET**

Soutenue devant le jury interrégional le 21 décembre 2017

Par **Mme Camille ALLAM**

Née le 18 Décembre 1990 à Lyon 2<sup>ème</sup> (69)

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

**T H E S E**

**Pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

\* \* \* \* \*

**TITRE DU MEMOIRE**

**REGULATION DES DIFFERENTES FORMES DU RECEPTEUR A L'INTERLEUKINE-  
7 ET EPUISEMENT LYMPHOCYTAIRE T  
CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CHOC SEPTIQUE**

\* \* \* \* \*

**JURY**

**PRESIDENT :** M. Guillaume MONNERET, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

**MEMBRES :** Mme Fabienne VENET, Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

Mme Sophie JARRAUD, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

M. Olivier THAUNAT, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier



## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. Frédéric FLEURY
- Présidence du Conseil Académique M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Didier REVEL
- Vice-Président de la Commission Recherche M. Fabrice VALLEE
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire M. Philippe CHEVALIER

### 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 : Mme Carole BURILLON
- 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 : Anne-Marie SCHOTT

#### 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. Yannick VANPOULLE
- Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) Directeur : M. Pascal FOURNIER
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE**

- CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)  
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)  
Madame Anne DENUZIERE (MCU)  
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)  
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)  
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)  
Madame Françoise FALSON (Pr)  
Monsieur Hatem FESSI (Pr)  
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)  
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)  
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)  
Madame Giovanna LOLLO (MCU)  
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)  
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

- BIOPHYSIQUE

Madame Laurence HEINRICH (MCU)  
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)  
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)  
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)  
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- DROIT DE LA SANTE

Monsieur François LOCHER (PU – PH)  
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- ECONOMIE DE LA SANTE

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)

Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- INFORMATION ET DOCUMENTATION

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)

Madame Claire GAILLARD (MCU)

- QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)

Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- MATHEMATIQUES – STATISTIQUES

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule GUSTIN (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 - HDR)

- CHIMIE THERAPEUTIQUE

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)

Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)

Madame Florence RANCHON (MCU-PH)

Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE**

- TOXICOLOGIE

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)

Madame Léa PAYEN (PU-PH)

Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH-HDR)

- PHYSIOLOGIE

Monsieur Christian BARRES (Pr)

Madame Kiao Ling LIU (MCU)

Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- PHARMACOLOGIE

Monsieur Michel TOD (PU – PH)

Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)

Monsieur Roger BESANCON (MCU)

Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)

Madame Evelyne CHANUT (MCU)

Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)

Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- COMMUNICATION

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES

Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)

Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A**

- IMMUNOLOGIE

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)

Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)

Madame Morgane GOSSEZ (AHU)

- HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)

Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)

Madame Sarah HUET (AHU)

Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

- MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)

Madame Florence MORFIN (PU – PH)

Monsieur Didier BLAHA (MCU)

Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)

Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)

Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)

Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)

Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE

Madame Pascale COHEN (Pr)

Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)

Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)  
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- BIOLOGIE CELLULAIRE

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-PAST)  
Madame Valérie VOIRON (MCU-PAST)

- Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques (AHU)

Monsieur Alexandre JANIN

- Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Madame Camille ROZIER

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

## SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

# REMERCIEMENTS

## Aux membres du jury

### **Monsieur le Professeur Guillaume Monneret**

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de Thèse. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et dans votre équipe de recherche, de m'avoir donné les moyens de mener à bien ces projets de Master et de Thèse, de votre soutien, exigence et encadrement pendant ces deux années. Je vous remercie également pour votre grande disponibilité, et vos précieux conseils d'orientation qui, je pense, m'ont aidé sur les plans professionnels et personnels. Je vous prie d'accepter le témoignage de mon admiration et l'expression de mon plus profond respect.

### **Madame le Professeur Sophie Jarraud**

Je vous remercie vivement d'avoir accepté d'évaluer mon travail de Thèse. J'estime beaucoup vos compétences et votre volonté de vous investir dans des travaux plus transversaux. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée pour la fin de mon internat et j'espère me rendre digne des futurs projets que je souhaite poursuivre au sein de votre équipe.

### **Monsieur le Professeur Oliver Thauat**

Je suis honorée de votre présence dans mon jury de Thèse. Votre expertise clinique et immunologique en tant que médecin transplanteur et spécialiste de l'immunosuppression apportera, je le pense, un regard enrichissant sur cette étude biologique descriptive.

### **Madame le Dr Fabienne Venet**

Je te remercie de m'avoir confié ce projet passionnant et varié et de m'avoir encadré tout au long de cette année de Master. J'ai énormément apprécié ta grande rigueur scientifique, ton exigence mais aussi ton dynamisme, ta pédagogie et ta bonne humeur communicative ! Je tiens à souligner ta grande disponibilité et ton investissement dans l'organisation et le suivi des projets des étudiants qui ont participé à mon épanouissement au sein du laboratoire. Tes nombreux enseignements et conseils m'ont, je le pense, permis de beaucoup progresser scientifiquement et personnellement. Je garderai un excellent souvenir de mon passage au sein de ton équipe.

## A ma famille

Ma chère **Maman**, des pages entières ne suffiraient pas pour te dire tout ce que je dois alors simplement merci pour ton soutien inconditionnel dans tout ce que j'entreprends, pour tes conseils et encouragements quotidiens. Merci de m'écouter les bons jours comme les moins bons, de me pousser à faire toujours mieux et de me donner confiance. Je t'aime. A **Bernard**, merci pour ta force, ta spontanéité et surtout tes sourires.

A **Papa**, j'admire énormément ton parcours qui force le respect. Tu es pour moi un exemple de volonté, de courage et de réussite. Merci aussi à Yasmine et à mes petits frères et sœurs, vous avoir dans ma vie et vous voir grandir me rend fière. A mes oncles et tantes, cousins et toute ma famille, merci de votre soutien et pour les moments partagés en famille

A mes grands-parents, partis trop tôt, ....

A **Nedra**, **Manel** et vos parents, merci de m'avoir accueilli dans votre famille. Nos moments partagés ont été riches en émotions, en rires et en rencontres. J'espère vous avoir dans ma vie encore longtemps.

Et enfin **May**, je te remercie infiniment pour tout le soutien que tu m'as apporté pendant ces longues années d'études. Merci pour ton grand investissement dans mes cours, préparations de thèse, concours, d'examens, et j'en passe. Merci de me faire rire, décompresser et me donner de la force au quotidien. Je nous souhaite beaucoup de confiance et de bonheur pour le futur. Je t'aime.

## A mes amis

**Adèle**, malgré la distance, tu restes toujours proche de moi. Merci pour cette longue et précieuse amitié, pour tous tes conseils avisés, pour nos discussions interminables, nos voyages ou escapades, j'en garderai d'excellents souvenirs. **David**, merci d'avoir toujours été là pendant ces années. Merci pour les fous-rires, les soirées, les nouvel ans, les virées lyonnaises et parisiennes, ces moments resteront dans ma mémoire.

A mes chères amies de pharmacie et leurs +1, **Alex** ma première binôme de TP et **Romain** : bonne continuation à tous les deux au Canada, vous allez nous manquer, et à nouveau félicitations ! **Cindy**, pour les week-ends à Saint-Cyr sur Mer, les (plutôt LA) soirées pharma et **Nico**, encore félicitations. **Yoyo** et **Silver** le couple de danseur talentueux, **Emilie** je te souhaite beaucoup de bonheur avec **Xavier**. Merci aussi à **Céleste**, **Sonia** et **Lisa**. Mention spéciale à **Johunnu**, merci pour l'entraide pendant l'année de concours, pour les week-end à paris, pour la visite présidentielle sous la pluie, et **Claire**, copine de BU pendant le concours d'internat, merci de me dépanner de médocs dans les pires moments, bon courage pour l'assistantat et je te souhaite le meilleur avec **Antoine**. Last but not least **Myrium** : merci pour toutes ces années de fous-rire, les soirées Safarix, PharmaRicaïn, Ayers, les galas, les before's à Versaille,

les cours d'anglais, merci pour BD, GD, PD, SS,... Les conversations sans fin, et merci pour ton oreille attentive et mature. Je te souhaite beaucoup de confiance et de réussite.

### **A mes collègues**

A toute l'équipe du labo d'immuno de l'hôpital Edouard Herriot : aux Dr **F. Poitevin.**, **C. Malcus** et **J. Bancel**, merci pour votre accueil au laboratoire et tous vos enseignements ces 2 semestres. **Anne, Cathy V, Françoise P, Brigitte, Sandrine, Agnès, Alizée, Laurence et Cathy M** la meilleure de toutes les secrétaires. Merci encore pour votre accueil, pour votre entraide et pour tous les bons moments partagés. Evoluer dans ce cadre familial mais néanmoins très pro a été un réel plaisir pour moi pendant ces deux années. J'espère que vous saurez maintenir cette ambiance particulière.

A l'équipe du LCR de HEH : merci pour votre accueil et votre encadrement. **Estelle** merci de m'avoir supervisée pour le M2 et soutenue à Cytima . Au **Dr J. Textoris** pour ta grande pédagogie et ta passion communicative pour les statistiques, l'immunologie et la Bio-info. **Babeth**, merci et pour le partage de tes connaissances en biologie moléculaire. **Mary-Luz, Cindy, Maxime, Laura, Florian et Boris** pour les escapades déjeuner hors du Labo et les afterwork. **François et Sophie**, merci pour les discussions enrichissantes lors des lab-meetings et lundi des PhD. Merci aussi aux étudiants PhD et notamment **Olivier** pour ton humour, **Marine, Chloé et Dina**, pour votre gentillesse.

### **A mes co-internes**

**Perrine**, the first one, merci pour le soutien pendant les galères de ma première garde à Lyon-Sud, pour ta rigueur en stage (procédure des folates... ), pour nos co-voiturations à Lyon Sud et dans toute la région, nos restos « des râleuses » mais surtout pour ta bonne humeur légendaire. Travailler à tes côtés a été un réel plaisir et j'espère garder contact malgré ton exil dans le sud. **Nico**, merci de m'avoir inculqué quelques notions médicales et appris à relativiser sur les délais de préparation d'un oral de DES ! **Cécile** ma première niveau 2, merci pour ta patiente et ta gentillesse et désolée d'avoir oublié 95% de mes connaissances en hémato...

A mes co-internes de bactério : Docteur **Poussin**, et sa tarte aux fraise inégalable, Miss **Ludivine** merci pour ta bonne humeur et ton soutien. A mes super niveaux 2 **Océane** et **Marie** pour le coaching, les tours en réa, les pauses café, etc... **Agathe** et **Claire**, merci pour ce que vous m'avez appris pendant ce semestre et félicitations pour votre parcours. **Perrine** « again », **Claire G** co-interne ces quelques semaines d'immunochimies furent courtes (la faute à un fichu trottoir) mais intenses ! **Rémi**, collègue immunologiste, et **Alicia** notre interniste renommée, qui m'a appris à décrypter les mystères des maladies auto-immunes, merci encore et bonne continuation !

Aux différents locataires du bureau des internes de HEH. Tout d'abord **Solenn** et **Clément**, nos deux joyeux lurons, mais non moins brillants réanimateurs, merci pour tous ces bons moments partagés, les soirées raclette, l'échappée game... Je vous souhaite le meilleur pour la suite ! A mes co-internes successifs : **Lucien** merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse, je te souhaite bon courage pour le M2. **David**, pour ton humour et tes talents de chanteur (Céline...) qui ont égayé le semestre d'hiver et **Grégory**, merci pour ce super semestre, et chapeau pour tes projets, je suis fan ! Merci aussi aux 5 AHU et stagiaires, notamment **Mehdi**, **Camille Junior** pour nos repas au petit Grillon, **Janie** de nous avoir fait voyager au Canada le temps d'un été et enfin **Jack**, pour m'avoir fait travailler mon anglais et enrichi ma culture britannique.

Et enfin à toute la joyeuse colonie de Bactériologistes en herbe (ou expérimentés ;) ) **Camille**, **Thomas**, **Thibault**, **Alexia**, **Lamia**, **Mélanie**, **Rémi**, **Marine**, **Léa**, **Lam-Thuy**, **Jordan** et **Aubin** qui m'auront appris à ne JAMAIS laisser ma boîte mail ouverte !

### **A mes amis de l'internat**

**Béa**, t'avoir retrouvé pendant ces longues années d'internat a été un vrai plaisir, merci pour ton oreille toujours attentive et de bon conseil. Merci pour la traditionnelle soirée de Noël, pour l'organisation des apéros, et autres repas. Ta persévérance et ta volonté sont impressionnantes je te souhaite beaucoup de succès ! **Coco**, merci pour les soirées crêpe chez toi, pour ta bonne humeur et enfin **Pauline B**, merci pour la médaille ;) , **Marion D**, **Vincent**, et **Manon**.

Merci aux membres du bureau SIPHL 2015-2017 : **Amélie**, **Florian**, **Camille K**, **Pauline P**, **Laurent**, bravo pour tout le travail engagé aux commissions et aux événements. Merci pour les réunions pizza, les soirées, les week-end ski...

### **A mes collègues du M2 infectiologie fondamentale**

A **Marine**, l'interne globetrotteuse, ton parcours est déjà impressionnant j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi cette année, **Emmanuelle** et **Myriam** pour votre bonne humeur et mais aussi **Bruno**, je te souhaite beaucoup de courage et de la confiance, **Rodolphe**, **Louis** et **Corentin** pour votre passion pour la bactériologie (et R) et finalement **Youssef**, **Lobna**, **Lou**, et tous les autres, merci pour tous ces moments partagés pendant cette année de « retour à l'école »

### **Et enfin aux plus talentueuses**

**Julie D**, ton influence m'a beaucoup inspiré pour l'élaboration de cette thèse. Je suis très heureuse de t'avoir rencontré et te remercie de m'avoir soutenue dans les bons moments comme les moins bons. Je te félicite pour ton parcours et te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle vie d'AHU Lilloise. J'espère te revoir bientôt sur Lyon.

**Julie M**, je suis ravie que l'on ait été amené à collaborer plus de 15 après avoir partagé les bancs de l'école maternelle ! Je tiens à te remercier pour ce travail partagé, toujours dans la bonne humeur, pour ton approche des choses, pour ta rigueur et ta persévérance et pour tout ce que tu m'as appris pendant ces quelques mois. Je te souhaite bon courage pour la dernière année de thèse, l'IL7R n'aura plus aucun secret pour toi !

**Morgane**, merci infiniment pour tous ces moments partagés au laboratoire et en dehors qui ont été un réel plaisir. J'ai énormément apprécié ta gentillesse, tes encouragements, tes enseignements et autres conseils. Merci de m'avoir fait confiance pour t'aider pour l'Aquios, et tes manips souris. Je suis admirative de ton parcours et te souhaite bon courage pour la suite de l'AHU et une belle vie dans ta nouvelle maison à la Croix-Roussienne !

# Table des matières

Liste des abréviations.....	16
Liste des figures.....	19
Liste des tableaux.....	19
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Présentation des états septiques.....	23
1.1. Définitions.....	23
1.1.1. Anciennes définitions.....	23
1.1.2. Evolution de la définition du sepsis.....	24
1.2. Epidémiologie.....	26
1.2.1. Incidence et coûts en France et dans le monde.....	26
1.2.2. Pronostic et mortalité.....	27
1.2.3. Etiologies infectieuses.....	28
1.2.4. Facteurs de risques et de gravité.....	29
1.3. Diagnostic clinique et microbiologique.....	29
1.4. Prise en charge thérapeutique.....	31
1.4.1. Suppléance des défaillances d'organe.....	31
1.4.2. Antibiothérapie.....	32
1.4.3. Nouvelles approches thérapeutiques.....	32
2. Immuno-pathologie des états septiques.....	33
2.1. Phase précoce de reconnaissance microbienne.....	33
2.2. Réponse immuno- inflammatoire au cours du sepsis.....	35
2.2.1. Déclenchement et amplification de la cascade pro-inflammatoire.....	35
2.2.2. Stress oxydatif et défaut du métabolisme cellulaire.....	36
2.2.3. Augmentation de la perméabilité vasculaire.....	36
2.2.4. Activation de la coagulation.....	36
2.3. Mise en place des mécanismes immunosuppresseurs compensateurs.....	37
2.3.1. Altération de la réponse innée.....	38
2.3.2. Altérations de la réponse adaptative.....	41
2.4. Thérapies immunostimulantes.....	45
3. L'interleukine 7 et son récepteur dans le choc septique.....	48
3.1. Interleukine 7 : origine et structure.....	48

3.2.	Récepteur à l'Interleukine 7 .....	48
3.2.1.	Récepteur membranaire (IL-7R $\alpha$ ) .....	48
3.2.2.	Récepteur soluble (sCD127) .....	49
3.2.3.	Gène de l'IL7R.....	49
3.3.	Fonctions biologiques de la voie IL-7/IL-7R $\alpha$ .....	50
3.4.	Régulation du récepteur membranaire en physiologie .....	52
3.4.1.	Lymphocytes T.....	52
3.4.2.	Lymphocytes B .....	53
3.5.	Implication du récepteur à l'IL-7 en pathologie.....	54
3.5.1.	Déficit congénital en IL-7R $\alpha$ .....	54
3.5.2.	Sclérose en plaque .....	54
3.5.3.	Epuisement lymphocytaire T.....	54
3.6.	Données dans le choc septique.....	55
4.	Conclusion .....	57

#### TRAVAIL PERSONNEL

1.	Introduction et objectifs.....	59
2.	Matériels et méthodes .....	60
2.1.	Population d'étude et déroulement .....	60
2.2.	Cytométrie en flux.....	61
2.2.1.	Marquages de surface.....	61
2.2.2.	Mesures fonctionnelles.....	62
2.2.2.1.	Cytokines intracellulaires .....	62
2.3.	Purification des lymphocytes T .....	63
2.4.	Mesure des ARNm de l'IL7R .....	64
2.5.	Dosage du CD127 soluble.....	66
2.6.	Analyses statistiques .....	66
3.	Résultats expérimentaux.....	67
3.1.	Cohorte d'étude, caractéristiques cliniques et biologiques.....	67
3.2.	Régulation du récepteur à l'IL-7 .....	70
3.2.1.	Régulation du récepteur membranaire.....	70
3.2.2.	Régulation de la protéine soluble .....	75
3.2.3.	Régulation des ARN messagers sur les lymphocytes T purifiés .....	76
3.3.	Altérations phénotypiques et fonctionnelles lymphocytaires T en lien avec l'IL-7R $\alpha$ .....	77

3.3.1. Surexpression des populations PD-1 <sup>+</sup> et CD127 <sup>-</sup> /PD-1 <sup>+</sup> .....	77
3.3.2. Caractérisation de la population CD127 <sup>-</sup> /PD-1 <sup>+</sup> au sein des stades d'activation T CD4 <sup>+</sup> et T CD8 <sup>+</sup> .....	79
3.3.3. Etude fonctionnelle des lymphocytes T .....	81
Discussion .....	86
Limites .....	90
CONCLUSIONS	
Références Bibliographiques.....	94

# Liste des abréviations

°C	Degrés Celsius
AA	Acide Aminé
ACCP	American College of Chest Physicians
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
AF	Alexa Fluor
AKT	Protéine Kinase B
AP	Protéine Activatrice
APC	Allophycocyanin
ARNm	Acide Ribo Nucléique Messenger
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BAD	Bcl-2-Associated Death Promoter
BAX	Bcl-2 Associated-X Protein
BCL	B-Cell Lymphoma
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
BIM	Bcl-2-Like Protein 11 Bcl-2-Associated Death Promoter,
BTLA	B- And T-Lymphocyte Attenuator
CBL-B	Cbl Proto Oncogene B
CCL	Chemokine Ligand
CD	Cluster of Differentiation
CDC 25a	Cell Division Cycle 25a
CIVD	Coagulation Intra Vasculaire Disséminée
CLR	C-Type Lectin Receptor
CMH	Complexe Majeur D'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule Présentatrice D'antigène
CRP	Protéine C Réactive
CSF	Stem Cell Factor
CSH	Cellules Souches Hématopoiétiques
CTLA	Cytotoxic T Lymphocyte Associated Molecule
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DICS	Déficit Immunitaire Combiné Sévère
E2a	Immunoglobulin Enhancer-Binding Factor
EBf	Early B-Cell Factor 1
ECBU	Examen Cyto-Bactériologique Des Urines
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique
EOS	Espèce Réactive De L'oxygène
FiO2	Fraction Inspirée En Oxygène
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanine
FOXO	Forkhead Box Protein O
FoxP3	Forkhead Box P3
FSC	Forward Scatter
GABP	Gaba-Binding Protein
GFI	Growth Factor Indepenant
GLYR1	Glyoxylate Reductase 1 Homolog
GM-CSF	Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor
GRO	Growth Regulated Oncogene
HLA	Human Leukocyte Antigen

HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HSP	Heat Shock Protein
HSV	Herpès Simplex Virus
IFN $\gamma$	Interféron Gamma
IGS	Indice De Gravité Simplifié
IL	Interleukine
IN	Infection Nosocomiale
INOs	Oxyde Nitrite Synthase Inductible
IRF	Interferon Regulatory Factor
IV	Intraveineuse
JAK	Janus Kinase
KRO	Krome Orange
LCMV	Virus De La Chorioméningite Lymphocytaire
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LPS	Lipopolysaccharide
MCL	Myeloid Cell Leukemia
MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cells
NFk-B	Nuclear Factor Kappa B
NK	Natural Killer
NLR	Nod-Like Receptor
NO	Monoxyde D'azote
PAF	Platelet Activation Factor
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PaO <sub>2</sub>	Pression Partielle En Oxygène
PAS	Pression Artérielle Systolique
PAX	Paired Box
PB	Paire De Base
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PC	Phycoerythrocyanine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCT	Procalcitonine
PD-1/PDL-1	Programmed Death/ Programmed Death Ligand
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohemmaglutinine
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl Inositol Diphosphate
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidyl Inositol Triphosphate
PMA	Phorbol 12 Myristate 13 Acetate
PNN	Poly-Nucléaires Neutrophiles
PPIB	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase B
PRR	Pattern Recognition Receptors
PVC	Pression Veineuse Centrale
RAG	Recombination Activating Genes
RANBP3	Ran Binding Protein 3
RhIL-7	Interleukine 7 Recombinante Humaine
RIN	RNA Integrity Number
SAPS	Simplified Accute Physiological Score
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SEP	Sclérose En Plaque
SOCS 1	Suppressor Of Cytokine Signaling
SOFA	Sepsis Related Organ Failure Assessment
SRIS	Syndrome De Réponse Inflammatoire Systémique

SSC	Side Scatter
STAT	Signal Transducer and Activator Of Transcription
TBS	Tris Buffered Saline
TGF	Transforming Growth Factor
TH	T-Helper
TIM	T Cell Immunoglobulin And Mucin Domain Containing
TLR	Toll Like Receptor
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor Alpha
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
T <sub>regs</sub>	Lymphocytes T Régulateurs
VHC	Virus L'hépatite C
VIH	Virus De L'immunodéficience Humaine

## Liste des figures

Figure 1 : Ancienne définition des syndromes septiques .....	24
Figure 2 : Algorithme diagnostique du sepsis et du choc septique selon la définition de 2016 .....	25
Figure 3 : Incidence des syndromes septiques entre 1979 et 2007 .....	27
Figure 4 : Distribution biphasique de la mortalité dans le sepsis .....	28
Figure 5 : Atteintes d'organes au cours du choc septique .....	30
Figure 6 : Déclenchement de la réaction inflammatoire anti-infectieuse .....	34
Figure 7 : Réponse de l'hôte dans le sepsis.....	35
Figure 8 : Altérations des cellules du système immunitaire inné et adaptatif dans le sepsis.....	38
Figure 9 : Déviation de la myélopoïèse dans le sepsis vers la synthèse de PNN immatures. ....	39
Figure 10 : Lymphopénie circulante et mortalité dans le sepsis. D'après (58) .....	41
Figure 11 : Altérations fonctionnelles lymphocytaires T au cours du sepsis .....	43
Figure 12 : Développement progressif d'un épuisement lymphocytaire T.....	45
Figure 13 : Expression des ARNm transcrits du gène de l'IL-7R .....	50
Figure 14 : voies de signalisation de l'IL-7 après liaison à son récepteur membranaire .....	51
Figure 15 : Expression du récepteur à l'IL-7 en fonction des stades de maturation lymphocytaires .....	52
Figure 16 : Expression de l'IL-7R $\alpha$ sur les différents stades de la lignée lymphocytaire B .....	53
Figure 17 : Expression des marqueurs dans les granules cytotoxiques des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	63
Figure 18 : Enrichissement cellulaire par le réactif RosetteSep.....	64
Figure 19 : Localisation des amorces PCR communes et spécifiques à chaque transcrite du gène de l'IL7R.....	65
Figure 20 : Données biologiques des patients en CS en comparaison aux données contrôles ..	69
Figure 21 : Expression du CD127 sur les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> .....	71
Figure 22 : Répartition des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> .....	73
Figure 23 : Concentration plasmatique (ng/mL) du récepteur soluble à l'IL-7 .....	75
Figure 24 : Expressions des ARNm de l'IL7R normalisée par l'expression .....	76
Figure 25 : Production intracellulaire d'IFN $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF $\alpha$ .....	83
Figure 26 : Mesure des capacités de dégranulation des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	85

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Traitements immunomodulateurs potentiels et bénéfiques dans le sepsis.....	46
Tableau 2 : Données cliniques et démographiques des patients en CS.....	68

# Introduction

Les syndromes septiques sont une préoccupation majeure de santé publique. Ils représentent la cause principale d'admission en réanimation et un facteur de mortalité élevé (1–4). Leur augmentation est importante ces dernières années du fait du vieillissement de la population, de l'administration importante de traitements immunosuppresseurs, des chimiothérapies et des chirurgies lourdes, affectant les capacités de défenses immunitaires de l'hôte (1,5).

La forme la plus grave du sepsis est le choc septique caractérisée par une défaillance multiviscérale. A la suite de cet état de choc, comme dans d'autres types d'agressions systémiques (polytraumatisme, brûlure sévère), se développe de façon concomitante un syndrome inflammatoire intense balancé par une phase d'immunoparalysie touchant à la fois les versants innés et acquis de l'immunité (6–8). En particulier, il a été montré que les lymphocytes T subissent une forte apoptose, et sont altérés dans leurs fonctions (diminution de la production d'Interféron gamma (IFN $\gamma$ ), augmentation des lymphocytes T régulateurs (T<sub>regs</sub>)) (9–11). L'immunosuppression est associée chez certains patients au développement d'infections nosocomiales (IN), à des réactivations de virus latents (Herpès Simplex Virus (HSV), Cytomégalo virus (CMV)) et à une mortalité accrue (12).

C'est pourquoi, ces dernières années, après de multiples tentatives infructueuses de limiter la phase initiale par des traitements anti-inflammatoires (anti-Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ), antagoniste du récepteur de l'Interleukine 1 (IL-1Ra)) (13); les efforts de recherche ont porté sur une possible reconstitution du statut immunitaire suite à la phase immunosuppressive par des traitements immunostimulants. Parmi ceux-ci, l'Interleukine-7 (IL-7) apparaît comme un agent prometteur (14–16).

L'IL-7 est une cytokine indispensable à l'homéostasie des cellules T. Elle agit via un récepteur membranaire à la surface des lymphocytes T composé d'une chaîne commune gamma et d'une partie spécifique (IL-7R $\alpha$  ou CD127). Une forme soluble du récepteur (sCD127) est également libérée dans la circulation sanguine (17). Au niveau transcriptionnel, plusieurs variants du gène de l'IL7R ont été décrits, parmi lesquels un transcrit majoritaire IL7R-1 codant pour la protéine transmembranaire et deux transcrits IL7R-3 et IL7R-7 potentiellement codant pour la forme soluble.

Par ailleurs, en situation de stimulation antigénique permanente (infections virales chroniques, cancers...), se développe progressivement un processus d'épuisement lymphocytaire T (ou « T-cell exhaustion » en anglais) (18). Il est défini par la perte progressive des fonctions effectrices, par une forte expression de récepteurs inhibiteurs de surface ou « checkpoints-inhibiteurs », dont Programmed Death 1 (PD-1) et par une diminution d'expression des récepteurs aux signaux de survie, dont l'IL-7. Ce processus d'épuisement a aussi été décrit dans le sepsis.

Néanmoins, dans ce contexte, l'étude de l'expression du récepteur à l'IL-7 n'est pas exhaustive et le lien entre sa régulation et les altérations lymphocytaires T n'est pas encore bien caractérisé. La première partie de cette thèse est constituée d'une revue bibliographique avec des rappels sur la définition, l'immuno-pathologie du sepsis et sur la voie de l'Interleukine-7. La seconde partie porte sur un travail expérimental visant à évaluer l'expression de différentes formes du récepteur à l'IL-7 et à les relier aux altérations phénotypiques et fonctionnelles lymphocytaires T induites par le choc septique.



# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



# 1. Présentation des états septiques

## 1.1. Définitions

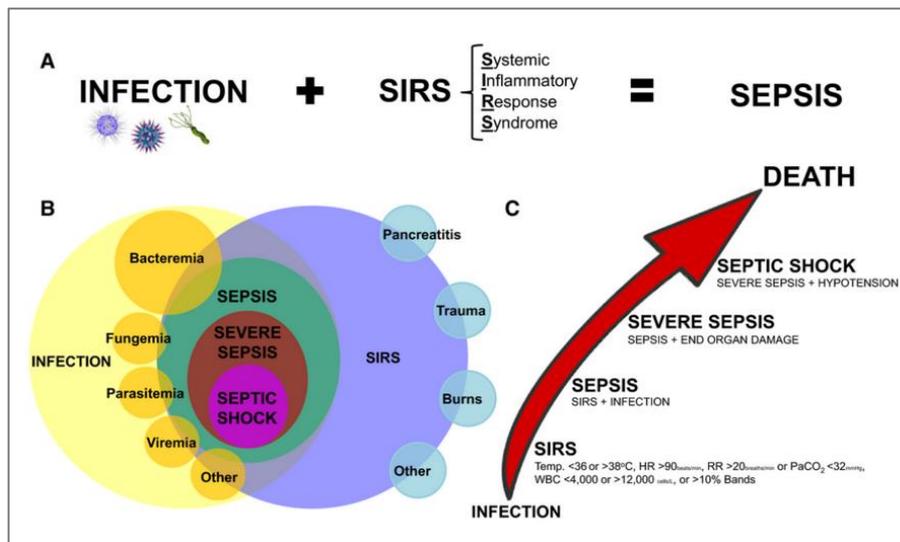
### 1.1.1. Anciennes définitions

Le sepsis, terme provenant du grec ancien *σήψις* pour « putréfaction » correspond à une réponse systémique lors d'une infection grave, le plus souvent mortelle avant l'essor de l'antibiothérapie moderne. Il était anciennement désigné sous le terme de septicémie signifiant littéralement « infection du sang ». Bien que la notion de sepsis ait été décrite depuis plusieurs millénaires, les connaissances de sa physiopathologie et en particulier, de la réponse de l'hôte n'ont été précisément étudiées que pendant ces trois dernières décennies.

En 1992, l'« American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine » (ACCP/SCCM) a classé pour la première fois la notion de sepsis en plusieurs stades de gravité (Figure 1) (19). Puis, en 2001, une nouvelle conférence de consensus (International Sepsis Definitions Conference) a confirmé cette définition graduelle des états septiques (20). Le premier stade est le syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SRIS défini cliniquement par la présence d'au moins deux signes parmi :

- Une température corporelle  $>38^{\circ}\text{C}$  ou  $<36^{\circ}\text{C}$
- Une fréquence cardiaque  $>90$  battements par minute
- Une fréquence respiratoire  $>20/\text{min}$  ou hyperventilation avec  $\text{PaCO}_2 < 32$  mm Hg
- Une leucocytose  $> 12\,000/\text{mm}^3$  ou  $<4000/\text{mm}^3$

Le SRIS est un processus de réponse non spécifique à une infection également retrouvé et dans d'autres situations aiguës telles qu'un traumatisme sévère, une brûlure grave ou un arrêt cardio-pulmonaire. Ensuite, le sepsis est un SRIS associé à un processus infectieux en cours, puis le sepsis sévère correspond à un sepsis avec une ou plusieurs défaillance(s) d'organe(s), parmi une hypotension (Pression Artérielle Systolique (PAS)  $>90\text{mmHg}$  ou Pression Artérielle Diastolique (PAD)  $<40\text{mmHg}$ ) ou une hypoperfusion d'organes ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 280$ , acidose lactique, oligurie  $<0,5$  ml/kg/h) ou une altération des fonctions supérieures. Le stade le plus sévère est le choc septique pour lequel l'hypotension et/ou la défaillance d'organe est persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat et/ou nécessitant l'administration d'amines vasoactives (adrénaline, noradrénaline).



**Figure 1 : Ancienne définition des syndromes septiques**

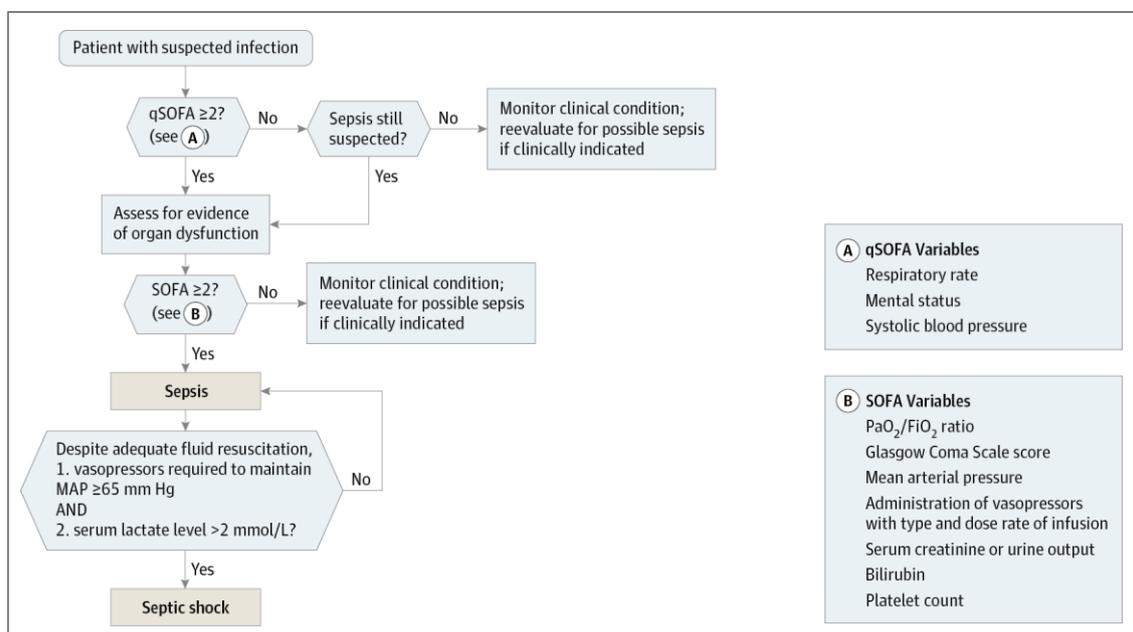
(A) La notion de sepsis était définie comme la présence d'un SRIS et d'une infection. (B) Les syndromes septiques sont un continuum clinique et englobent plusieurs étiologies infectieuses. D'après (19)

La classification de la réponse inflammatoire systémique à une infection en quatre stades a de nombreuses limites. En effet, le SRIS est une notion globale pouvant concerner jusqu'à 90% des patients admis en réanimation, non spécifique, et faisant partie intégrante d'une réponse physiologique à une infection (5). Elle ne tient compte ni de la durée, ni de l'origine de l'infection, ni de l'hétérogénéité de la réponse des patients. De plus, elle est peu standardisée et source d'une grande hétérogénéité diagnostique entre les pays.

### 1.1.2. Evolution de la définition du sepsis

La définition du sepsis a été révisée en 2016 par un groupe de travail de la « Society of Critical Care Medicine » et de la « European Society of Intensive Care Medicine » au cours du « Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock » (Sepsis-3) (21). Les éléments d'orientation principaux sont présentés dans la figure 2. Le sepsis est maintenant caractérisé comme « une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causée par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection ». Concrètement, la dysfonction d'organe est objectivée par une augmentation du score SOFA (Sepsis related Organ Failure Assessment) de 2 points ce qui reflète un risque de mortalité hospitalière de 10% supplémentaire. Au sein de cette dénomination, le choc septique est un sous-groupe concrètement défini par la nécessité d'administration de traitements vasoactifs pour maintenir une pression artérielle moyenne

(PAM) supérieure à 65 mm Hg et une lactatémie inférieure à 2 mmol/L. Il s'accompagne de dysfonctions circulatoires, cellulaires et métaboliques profondes associées à une mortalité hospitalière allant jusqu'à 40%.



**Figure 2 : Algorithme diagnostique du sepsis et du choc septique selon la définition de 2016**

Le nouvel algorithme décisionnel inclut les scores cliniques qSOFA et SOFA. D'après (21)

Le SOFA est calculé en attribuant un score variant de 0 à 5 selon le degré d'altération de chaque groupe d'organe (cardio-respiratoire, rénal, hépatique, neurologique) (Figure 2). La conférence de consensus introduit aussi la définition du score quick SOFA (qSOFA) pour identifier plus rapidement et en dehors des services de réanimation les patients susceptibles de correspondre à la nouvelle définition du sepsis. Il repose sur les 3 critères suivants :

- Rythme respiratoire > 22/min
- Altération des facultés mentales
- Pression artérielle systolique (PAS) <100 mm Hg

La présence d'au moins 2 critères qSOFA définit ainsi une population de patients à risque septique important et/ou justifiant un monitoring accru.

Les avantages de la nouvelle définition sont multiples (22). D'abord, le terme de « réponse inappropriée » de l'hôte est plus adéquat à la situation du choc septique car elle s'oppose à une réponse régulée lors d'une infection non compliquée. Puis, elle s'affranchit de la notion faiblement spécifique de SRIS amenant à des diagnostics par excès. L'appellation

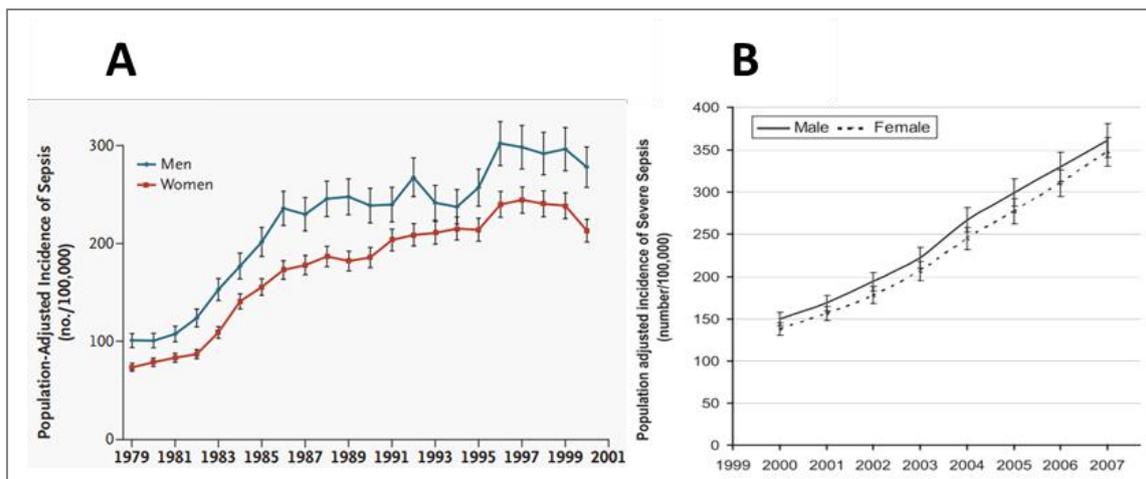
« sepsis grave » de l'ancienne définition était également source de confusion puisque tout état septique peut être considéré comme sévère. Par ailleurs, l'évaluation de la défaillance organique par le score SOFA permet une standardisation des patients, ce qui est un avantage pour l'homogénéisation des cohortes dans les études épidémiologiques et cliniques. En revanche, la sensibilité de la nouvelle définition est réduite. En limitant le diagnostic positif du choc septique à une dysfonction d'organe importante et à une lactatémie > 2 mmol/L, elle tend à sélectionner les cas les plus sévères et peut mener à un diagnostic tardif. Par ailleurs, la détermination du score SOFA n'est pas aisée hors des services de réanimation, notamment aux urgences, car il doit souvent être vérifié pendant plusieurs jours d'affilé et nécessite l'accessibilité à des tests de laboratoire pour le dosage des lactates.

## **1.2. Epidémiologie**

### **1.2.1. Incidence et coûts en France et dans le monde**

Les syndromes septiques restent un problème majeur de santé publique depuis plusieurs décennies à la fois dans les pays dits développés et en voie de développement. Leur incidence est en constante élévation en France et dans le monde depuis les 40 dernières années (Figure 3) (23,24). Une méta-analyse publiée en 2016 a également montré une augmentation des nouveaux cas sur les 10 dernières années, passant de 288 à 437 pour 100 000 habitants pour le sepsis et de 148 à 270 pour 100 000 habitants pour le sepsis sévère (25). En 2012, il a été estimé que 20 millions de personnes étaient atteintes de sepsis chaque année dans le monde dont 1 à 3 millions aux Etats-Unis d'Amérique (USA) (21). En France, la fréquence des admissions en réanimation pour une cause septique est passée de 8,2% en 1993 à 15,4% en 2010 (2). L'augmentation de l'incidence des états septiques peut être reliée au vieillissement de la population, à la progression des maladies chroniques, des chirurgies lourdes, des traitements immunosuppresseurs et à l'émergence de bactéries multi-résistantes (23). Cependant, le recueil épidémiologique très hétérogène de l'incidence et de la mortalité entre les pays rend difficile l'interprétation de ces données (25).

Le sepsis a aussi un impact économique important. En effet, la durée de séjour moyenne en soins intensif est estimée à 9,5 jours aux Etats-Unis (26). Les coûts d'hospitalisation associés sont évalués à environ 17 milliards de dollars par an (27).



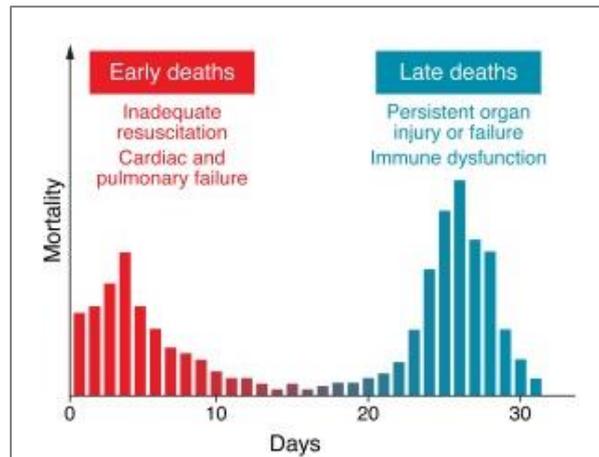
**Figure 3 : Incidence des syndromes septiques entre 1979 et 2007**

Données ajustées selon le sexe entre 1979 et 2000 (A), (d'après (23)) et entre 1999 et 2007 (B), (d'après (24))

### 1.2.2. Pronostic et mortalité

La sévérité des patients septiques à l'admission en service de soins intensifs, représentée par le score IGS II (Indice de Gravité Simplifié ou SAPS II « Simplified Acute Physiology Score » en anglais) est également en constante augmentation. De plus, malgré les avancées diagnostiques et thérapeutiques ayant permis une amélioration du pronostic ces vingt dernières années, la mortalité associée reste très préoccupante. Le choc septique est la première cause de décès en réanimation dans le monde (1,3). En France, elle est estimée à 48,7% en 2011 pour le choc septique (2). Une étude publiée en 2017 a confirmé la gravité des états septiques aux Etats-Unis, puisqu'ils engendrent une mortalité hospitalière d'environ 15%, en considérant le sepsis simple au choc septique (4).

La mortalité précoce intervient dans les premiers jours par défaillance multi-viscérale le plus souvent à cause d'une prise en charge trop tardive ou de mesures de réanimation insuffisantes. Néanmoins, les progrès diagnostiques et thérapeutiques, notamment en termes d'antibiothérapie ont permis aux patients de mieux survivre à la phase initiale pro-inflammatoire. A plus long terme, un état prolongé d'immunoparalysie et de défaillance circulatoire entraîne de persistantes modifications immunitaires et métaboliques à l'origine d'une augmentation des INs et des décès (Figure 4) (6,8,28).



**Figure 4 : Distribution biphasique de la mortalité dans le sepsis**

Les décès précoces surviennent dans les 10 premiers jours et sont dus à une réanimation non adéquate ou à des défaillances d'organe alors que les décès plus tardifs sont le résultat des dysfonctions immunitaires et d'anomalies métaboliques persistantes. D'après (28)

D'autre part, les patients qui survivent à un choc septique présentent des séquelles physiques et cognitives à long terme comme en témoigne une étude de 2010 (29). Sur une cohorte de 1100 patients, ces travaux ont montré que les patients survivants avaient environ trois fois plus de risque de développer des séquelles cognitives (altération de la mémoire, désorientation), et avaient globalement plus d'invalidité dans leurs activités quotidiennes jusqu'à 8 ans après le choc.

### 1.2.3. Etiologies infectieuses

En terme de fréquence, une étude rétrospective multicentrique de 2014 sur environ 8000 patients a identifié les pneumopathies infectieuses comme étiologie principale (50-60%) (3,30) suivies par les infections abdominales (9-23%), urinaires (8-10%) et enfin les infections liées aux dispositifs médicaux (6-15%) (30). Cependant, une identification microbiologique précise n'est établie que dans 70% des cas. Les micro-organismes pathogènes les plus fréquemment isolés sont des bactéries puis des champignons et virus. Une étude européenne de 2006 a montré que 62% des isolats microbiologiques issus de patients en choc septique étaient des bactéries à Gram négatif (par ordre de fréquence, *E. coli* puis *P. aeruginosa*), 47% des Gram positif (majoritairement *S. aureus*) et 19% des champignons, essentiellement des levures (31). Depuis les années 2010, les bactéries à Gram positif sont plus fréquemment à

l'origine de sepsis que les bactéries à Gram négatif (200 000 *versus* 150 000 cas de sepsis par an aux USA) (32).

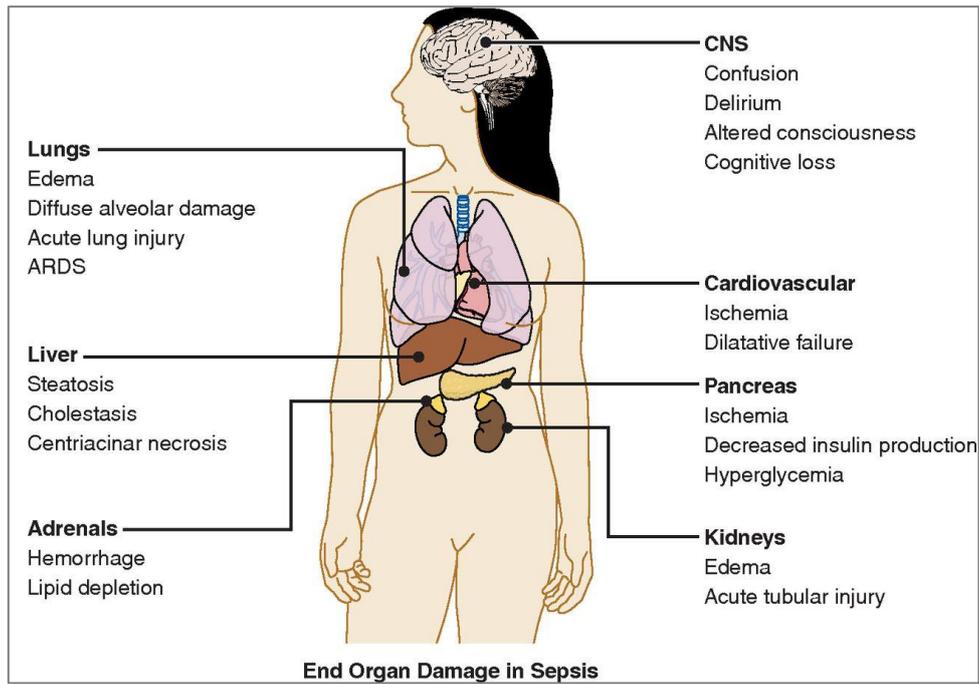
La gravité du sepsis est dépendante du site initial de l'infection : par exemple, les chocs dont le point de départ est d'origine digestive (cholécystite, pancréatite) ou les endocardites infectieuses ont une mortalité supérieure à 50%. A l'inverse, les infections systémiques à point de départ urinaire sont de moins mauvais pronostic (de 8 à 10% de mortalité) (28).

#### **1.2.4. Facteurs de risques et de gravité**

L'incidence du sepsis augmente constamment avec l'âge avec deux pics de fréquence aux âges extrêmes de la vie. Le sexe masculin semble être un facteur de risque mais la mortalité est équivalente entre les deux sexes. L'ethnie est également un critère influant, en effet, la fréquence du sepsis est plus élevée chez les non caucasiens, et plus particulièrement chez les Afro-Américains. La présence d'une ou plusieurs comorbidités : hypertension artérielle, diabète, insuffisance rénale chronique, atteinte hépatique... favorise la survenue d'une complication septique et est aussi un facteur aggravant (33).

### **1.3. Diagnostic clinique et microbiologique**

Les principaux signes cliniques rencontrés au cours sepsis sont assez peu spécifiques : hyper ou hypothermie, tachycardie, tachypnée, signes cutanés... Des éléments de gravité peuvent orienter vers le diagnostic de choc : signes hémodynamiques (hypoperfusion et/ou hypotension artérielle, tachycardie...), purpura, marbrures insuffisance rénale, acidose métabolique, troubles neurologiques (confusion, délirium, déficit cognitif). Les principales atteintes d'organes sont résumées dans la figure 5 (34).



**Figure 5 : Atteintes d'organes au cours du choc septique**  
D'après (34)

Au niveau biologique, on note une perturbation importante du bilan biochimique avec une hyperlactatémie, hyperglycémie, et une hypoxémie parfois très sévère en cas de syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) associé, une acidose métabolique, une insuffisance rénale aiguë, une cytolysé hépatique, une hyperbilirubinémie et parfois une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). On observe aussi très fréquemment une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles (PNN), une lymphopénie et un syndrome inflammatoire intense avec une augmentation de la protéine C réactive (CRP) et de la procalcitonine (PCT) (34).

L'origine microbienne d'un syndrome inflammatoire systémique peut être difficile à affirmer, par le manque de spécificité des critères de SRIS, l'hétérogénéité clinique des patients et de la difficulté d'identification d'une porte d'entrée infectieuse. Une simple suspicion clinique, dans un contexte de choc suffit à poser le diagnostic d'une provenance septique et à justifier l'initiation d'un traitement antibiotique.

Les prélèvements à visée microbiologique doivent être effectués dans les plus courts délais pour ne pas retarder l'antibiothérapie (34). Des hémocultures doivent être réalisées avec des prélèvements locaux sur le site infectieux suspecté (Examen Cyto Bactériologique des Urines (ECBU), prélèvements broncho-pulmonaires, ponction lombaire...) pour une

identification précoce du germe et pour limiter l'utilisation des antibiotiques à large spectre. De nouvelles techniques d'identification, reposant sur la biologie moléculaire, permettant d'identifier directement le micro-organisme à partir d'un prélèvement clinique sont actuellement à l'essai (35). Ils permettraient un gain de temps en réduisant la durée nécessaire à l'identification du micro-organisme. Des examens d'imagerie tels qu'une radiographie du thorax, un scanner cérébral et/ou abdominal peuvent apporter une aide précieuse à la localisation du foyer infectieux.

## **1.4. Prise en charge thérapeutique**

### **1.4.1. Suppléance des défaillances d'organe**

Globalement, le diagnostic et la prise en charge du choc septique sont indissociables et doivent être menés simultanément. En 2016, la « Surviving Sepsis Campaign » a émis une liste de 93 recommandations sur le traitement symptomatique précoce du sepsis et du choc septique (36). Parmi celles-ci, 32 sont des recommandations strictes avec un fort consensus et 39 sont des recommandations moins fortes. La priorité est de rétablir un état hémodynamique satisfaisant et d'assurer une ventilation efficace. Pour cela, un monitoring minimal des fonctions vitales (pression artérielle, pouls, saturation en O<sub>2</sub>, température, sondage urinaire) est rapidement mis en place. Puis, des mesures de supplémentation sont réalisées en urgence, visant à corriger au plus vite l'hypotension qui conditionne l'état de choc hypovolémique. Il est recommandé de procéder à un remplissage vasculaire par une solution de cristalloïdes (500mL/15min). Le but du remplissage est d'atteindre une pression veineuse centrale (PVC) entre 8 et 12 mm Hg et une PAM >65 mm Hg. Si le patient est réfractaire au remplissage (PAS <90 mm Hg ou PAD <40 mm Hg), il est alors nécessaire d'administrer des amines vasoactives. Par ailleurs, on instaure une oxygénothérapie pour assurer une saturation partielle en oxygène (SpO<sub>2</sub>) supérieure à 95%. D'autres traitements symptomatiques peuvent être mis en place : hémodialyse, nutrition entérale, insulinothérapie... L'emploi des corticoïdes est controversé et n'est pas recommandé si le remplissage vasculaire est suffisant pour rétablir une stabilité hémodynamique.

### **1.4.2. Antibiothérapie**

Les différents examens ne doivent pas retarder la mise en route d'une antibiothérapie adaptée. En effet, il a été montré que les premières heures étaient critiques pour diminuer la mortalité précoce du choc septique. Chaque heure de retard à l'administration des antibiotiques augmenterait la mortalité de 7,6% (37).

La revue de la « Surviving Sepsis Campaign » insiste sur l'administration rapide d'antibiotiques par voie intraveineuse (IV) dès la suspicion d'un choc d'origine septique (36). Le choix se fait en fonction du contexte clinique, du foyer infectieux identifié, des antécédents, et des pathologies associées. Il est recommandé d'utiliser des antimicrobiens à large spectre en monothérapie ou en combinaison pour couvrir les pathogènes les plus probables (en incluant les bactéries, virus, et champignons). Le traitement probabiliste doit être réévalué après l'identification formelle du pathogène et l'évaluation de sa sensibilité aux antimicrobiens. Des mesures de retrait de l'abord vasculaire infecté, de drainage percutané ou chirurgical du foyer infectieux sont aussi utiles en complément de l'antibiothérapie.

### **1.4.3. Nouvelles approches thérapeutiques**

La mortalité liée au sepsis intervient dans les 3 premiers jours pour 70% des cas. Cependant, les patients survivants présentent également un risque de mortalité supérieur à plus long terme à cause d'une dysfonction d'organe persistante et du développement plus élevé d'INs (28,38). Au cours des dernières décennies, plusieurs centaines d'essais cliniques ont été menés testant des agents anti-inflammatoires (anti-TNF $\alpha$ , anti-LPS, IL-1Ra, corticoïdes, immunoglobulines polyvalentes...) pour lutter contre la phase initiale de SRIS et n'ont globalement pas eu de résultats positifs (13). L'une des raisons possibles pour expliquer ces échecs est que les essais se basaient sur des modèles expérimentaux ne prenant pas suffisamment en compte la phase d'immunosuppression. Par ailleurs, les cohortes tests étaient de grandes tailles, hétérogènes, et non stratifiées selon le statut immunitaire des patients (13). Les approches thérapeutiques récentes avec des traitements immunostimulants intègrent donc les avancées sur la compréhension de l'immuno-pathologie du choc septique.

## 2. Immuno-pathologie des états septiques

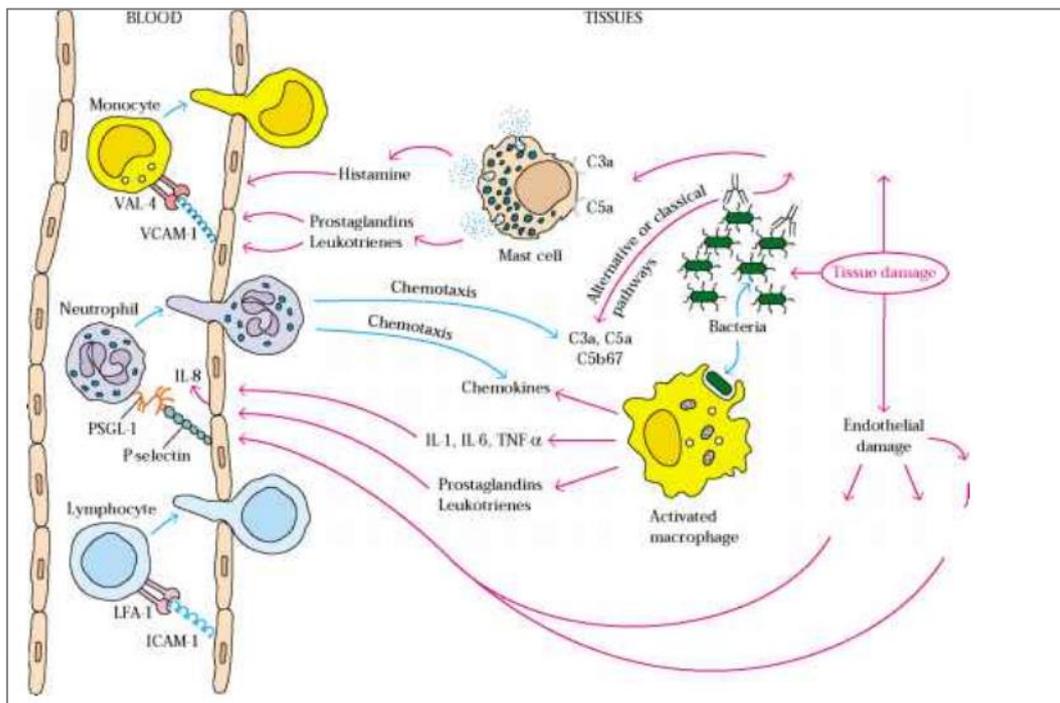
### 2.1. Phase précoce de reconnaissance microbienne

Lors de l'effraction d'un micro-organisme sous forme entière ou particulaire à travers les barrières cutané-muqueuses, une première ligne de défense antimicrobienne est déclenchée suite à la reconnaissance de motifs moléculaires non spécifiques associés aux micro-organismes ou « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMPs). Ils sont des composants des parois bactériennes (lipopolysaccharide, peptidoglycane) ou des flagelles (flagelline), des manannes de champignons ou des acides nucléiques bactériens et viraux. Les « Damage Associated Molecular Patterns » (DAMPs) sont des débris ou composant de cellules libérés par des tissus en apoptose (Heat Shock Protein (HSP), d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) ou d'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN) mitochondrial). Les PAMPs et DAMPs sont reconnus par des récepteurs non spécifiques membranaires ou cytoplasmiques appelés « Pattern Recognition Receptors » (PRR) exprimés essentiellement sur les cellules de l'immunité innée.

Parmi les PRR, on distingue les « Toll Like Receptor » (TLR), les « C-Type Lectin Receptor » (CLR) et les « NOD-like Receptor » (NLR). Le panel d'expression et la localisation cellulaire des TLRs est variable. La liaison du TLR à son récepteur entraîne sa dimérisation ce qui active différentes voies intracellulaires de signalisation entraînant notamment :

- L'activation de facteurs de transcription (Nuclear Factor Kappa B (NFκ-B), Protéine Activatrice 1 (AP-1), Interferon Regulatory Factor (IRF3)) qui induisent l'expression de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β, IL-18) et de chimiokines (IL-8, Chemokine Ligand 2 (CCL2))
- La libération de radicaux libres oxygénés ou nitrés et de divers peptides antimicrobiens
- L'expression de molécules de co-stimulation (CD80-CD86) et d'adhésion à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA)
- L'activation de la cascade de coagulation et des voies du complément

Puis, le signal inflammatoire est amplifié par les monocytes et macrophages grâce au recrutement des fractions du complément et à la sécrétion de neuropeptides comme la substance P. Il en résulte une migration des cellules phagocytaires activées et des lymphocytes par diapédèse et une destruction du pathogène localisée au niveau du site infectieux. Le déclenchement cellulaire de la réaction inflammatoire anti-infectieuse est résumé dans la figure 6 (39).



**Figure 6: Déclenchement de la réaction inflammatoire anti-infectieuse**  
D'après (40)

## 2.2. Réponse immuno- inflammatoire au cours du sepsis

### 2.2.1. Déclenchement et amplification de la cascade pro-inflammatoire

La sévérité du sepsis est en partie liée à la généralisation de l'inflammation et au dépassement des capacités de régulation de l'organisme. On parle alors d'une « réponse inappropriée de l'hôte à l'infection » en opposition à une infection localisée résolutive.

Les patients en état de choc subissent de profondes modifications immuno-inflammatoires. Dans les premières heures, l'activation globale des cellules de l'immunité innée par les PAMPs et DAMPs résulte en une réponse inflammatoire sévère. Cette réponse est classiquement qualifiée d'« orage cytokinique » du fait de la libération massive de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-17, IL-18, IFN $\gamma$ , Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF)) (41). De plus, l'amplification de la cascade du complément et la stimulation importante des cellules immunitaires exacerbe la réponse pro-inflammatoire. Ceci provoque des dommages cellulaires et tissulaires considérables participant aux dysfonctions d'organes et à la défaillance multi-viscérale dans les premières heures du sepsis (Figure 7) (28).

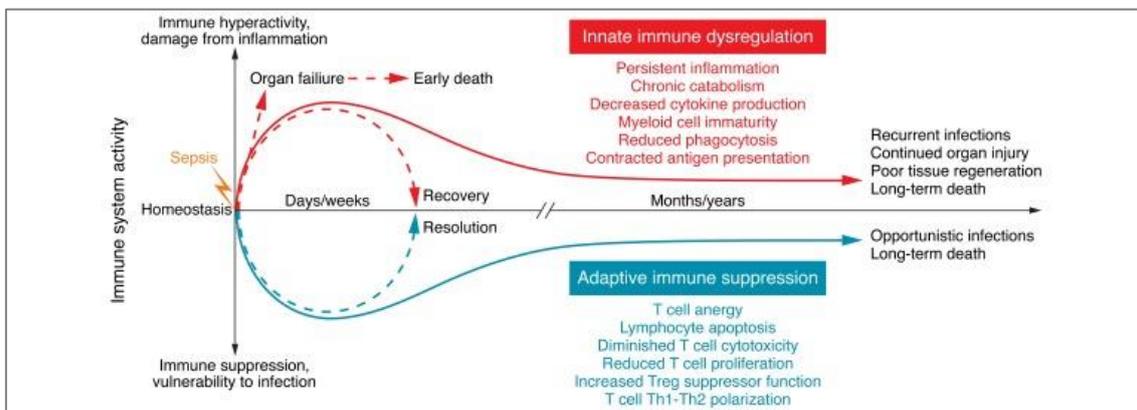


Figure 7 : Réponse de l'hôte dans le sepsis

D'après (28)

De façon simultanée, est mise en place une réponse compensatoire anti-inflammatoire pour limiter les effets délétères de l'inflammation excessive. Ainsi, dans la circulation sanguine des patients septiques, on retrouve des concentrations élevées en cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-6, IL-10, Transforming Growth Factor bêta (TGF- $\beta$ )...) (Figure 7) (41,42).

### **2.2.2. Stress oxydatif et défaut du métabolisme cellulaire**

Au niveau cellulaire, les médiateurs de l'inflammation, parmi lesquels l'IL-1, le TNF $\alpha$  et le monoxyde d'azote (NO) induisent un blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale et des fonctions métaboliques notamment de production d'ATP participant à l'état d'hypoxie cellulaire. Il a d'ailleurs été montré que la diminution de production d'ATP était corrélée à la sévérité du sepsis et à la survenue d'évènements indésirables (43). L'apport insuffisant en oxygène induit aussi des anomalies dans le métabolisme des nutriments (protéines, glucides, lipides), contribue à un fonctionnement cellulaire en anaérobiose et à la production de lactates.

### **2.2.3. Augmentation de la perméabilité vasculaire**

La libération de cytokines pro-inflammatoires induit une altération de l'endothélium et une vasodilatation capillaire engendrant une fuite liquidienne dans le milieu extracellulaire et une hypovolémie. Les anaphylatoxines (C3a et C5a), en concentrations élevées, augmentent la migration cellulaire au niveau des tissus. De grandes quantités de NO sont libérées par les cellules phagocytaires sous l'effet de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), participant aussi à l'altération vasculaire et à la réponse amoindrie aux catécholamines physiologiques. L'augmentation de la perméabilité vasculaire facilite également le passage de médiateurs cellulaires tels que les enzymes hépatiques, la créatinine ou la bilirubine dans la circulation sanguine, qui peuvent circuler à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) et de provoquer de lourdes conséquences neurologiques (7).

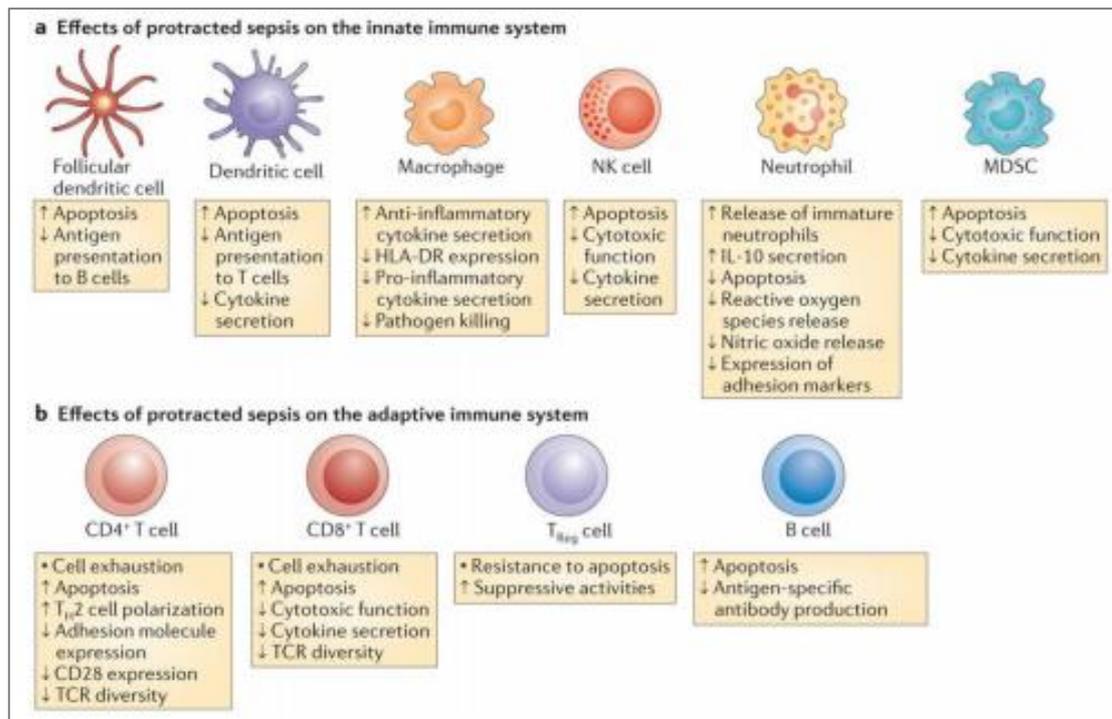
### **2.2.4. Activation de la coagulation**

La cascade de la coagulation est initiée lors des premières phases de la réponse inflammatoire et participe à la résolution d'une infection localisée. En revanche, dans le choc septique, les facteurs de coagulation sont activés de façon non contrôlée et diffusés dans le secteur vasculaire aboutissant à une génération excessive de thrombine, à la formation de micro-thrombi et à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Les médiateurs de l'inflammation induisent aussi la libération du « Platelet Activation Factor » (PAF) qui provoque

l'adhésion, l'agrégation et la dégranulation plaquettaire ce qui amplifie la cascade de coagulation intravasculaire. La CIVD est une complication majeure du choc septique qui peut provoquer des hémorragies par consommation des inhibiteurs physiologiques de la coagulation chez 30 à 50% des patients septiques (44). Tous ces phénomènes microcirculatoires et bioénergétiques participent à la diminution des apports tissulaires en oxygène, à l'hypoperfusion des organes et finalement à la défaillance multiviscérale liée au choc septique.

### **2.3. Mise en place des mécanismes immunosuppresseifs compensateurs**

Simultanément à la phase pro-inflammatoire, se met en place une forte réponse immuno-modulatrice qui contrebalance la réponse initiale mais qui peut persister et entraîner des conséquences délétères. La reprogrammation leucocytaire touche à la fois les versants innés et adaptatifs de la réponse immunitaire. L'intensité et la persistance de cet état d'immunoparalysie est à l'origine d'une survenue plus importante d'INs, d'un séjour prolongé en service de soins intensifs et d'une mortalité supérieure (Figure 7) (6,38). Les altérations des sous-populations cellulaires sont résumées dans la figure 8.



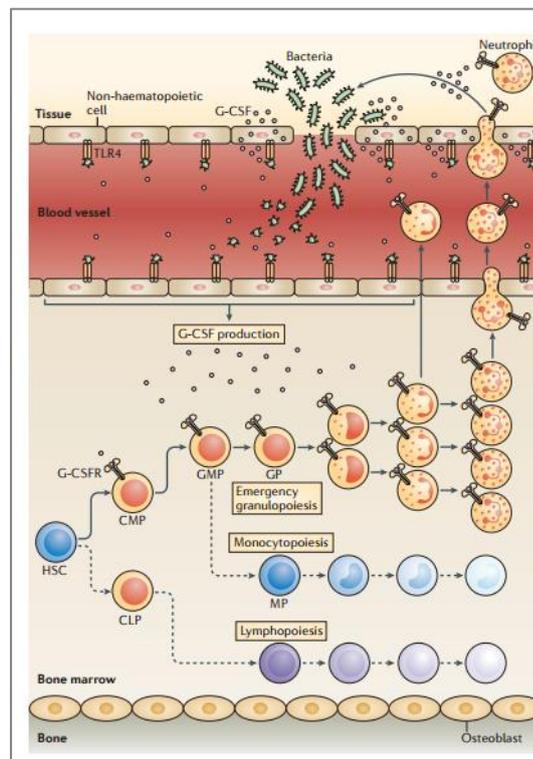
**Figure 8 : Altérations des cellules du système immunitaire inné et adaptatif dans le sepsis**  
D'après (6)

### 2.3.1. Altération de la réponse innée

#### 2.3.1.1. Polynucléaires neutrophiles

Concernant l'immunité innée, toutes les lignées cellulaires sont atteintes. En premier lieu, les PNN, acteurs essentiels de la lutte antibactérienne, montrent des altérations quantitatives et fonctionnelles majeures après un choc septique. Dans la circulation des patients septiques, on retrouve généralement une hyperleucocytose à PNN associée à une myélémie réactionnelle et une augmentation des neutrophiles immatures circulants (Figure 9) (45,46). Les PNN sont aussi altérés dans leurs fonctions de chimiotactisme, de migration au site d'infection et de phagocytose. On note ainsi une diminution de l'expression membranaire des sélectines CD62-L et de l'intégrine CD11b et une baisse des molécules favorisant le chimiotactisme : N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), GRO- $\alpha$  et IL-8. La production d'espèces réactives oxygénées (EOS), d'enzymes protéolytiques (myéloperoxydase, lactoferrine), et de cytokines effectrices sont altérées ; les voies de signalisations pro-inflammatoires intracellulaires médiées par NF $\kappa$ B sont diminuées (46).

Par ailleurs, l'apoptose différée des PNN est compensée par une libération de précurseurs immatures par la moelle osseuse, non compétents pour réaliser la phagocytose, et n'ayant pas de propriétés de migration, d'activation et d'éradication bactérienne des PNN matures (Figure 9) (45). A l'inverse, les lignées monocytaires et lymphoïdes sont moins productives. Ceci participe à la capacité amoindrie des PNN à détruire les micro-organismes et favorise le développement d'INs secondaires (6,45).



**Figure 9 : Déviation de la myélopoïèse dans le sepsis vers la synthèse de PNN immatures.**  
D'après (47)

### 2.3.1.2. Monocytes

Les monocytes et les macrophages sont également profondément atteints par le choc septique. Tout d'abord, ils présentent des capacités réduites de production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 et IL-12) et une déviation vers la production de médiateurs anti-inflammatoires suite à une stimulation par endotoxine (LPS). Ce phénomène, dénommé « tolérance à l'endotoxine », est aussi caractérisé par une importante diminution de l'expression de la molécule de présentation antigénique du complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH-II) ou « monocyte Human Leukocyte Antigen – DR » (mHLA-DR). La chute du mHLA-DR est un marqueur essentiel de l'anergie fonctionnelle monocytaire, du développement d'infections secondaires et de la mortalité dans le sepsis (48,49). La « tolérance à l'endotoxine » participe aussi à l'anergie lymphocytaire puisque l'on observe une diminution la prolifération lymphocytaire en présence de monocytes de patients septiques (50). Finalement, elle induit une moindre réponse face à une agression secondaire, et contribue au mauvais pronostic à court et long terme. Les mécanismes sous-jacents ne sont encore pas tout à fait élucidés, notamment en ce qui concerne l'impact fonctionnel de la régulation génétique et épigénétique monocytaire (51).

### 2.3.1.3. Autres sous-populations cellulaires

#### ✓ Cellules Natural Killers

Les cellules Natural Killers (NK) ou « cellules tueuses naturelles » ont la capacité de lyser une cellule infectée en l'absence d'immunisation préalable. Les deux sous-groupes de cellules NK, distingués par l'expression forte ou faible du CD56 à leur surface sont significativement altérés après un épisode septique. Leur expression membranaire des TLRs est modifiée et leur fonction cytotoxique, objectivée par la production d'IFN est diminuée (52).

#### ✓ Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques conventionnelles et plasmocytoïdes subissent aussi une forte apoptose accompagnée d'une baisse de l'expression de leur molécule du CMH II (HLA-DR) lors du sepsis (53). En effet, des études ont rapporté une diminution du nombre de cellules dendritiques spléniques et circulantes chez les sujets septiques par rapport à des contrôles (54).

#### ✓ MDSC

On note également une augmentation importante de la proportion des « Myeloid Derived Suppressor Cells » (MDSC), une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures ayant des propriétés immunosuppressives et notamment d'inhibition de la fonction

des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Elles peuvent atteindre jusqu'à 88% du contingent cellulaire de la moelle osseuse dans des modèles murins de sepsis (55).

### 2.3.2. Altérations de la réponse adaptative

#### 2.3.2.1. Apoptose et lymphopénie

Chez les patients septiques, on remarque une forte lymphopénie circulante, avec un taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulant inférieur à 300/mm<sup>3</sup> et de T CD8<sup>+</sup> inférieur à 200/mm<sup>3</sup> (56). En effet, l'apoptose lymphocytaire fait partie intégrante de l'immunoparalysie induite par le choc et touche les sous-populations T, B et NK (9,56,57). Elle est présente à la fois dans la circulation sanguine et dans les organes lymphoïdes (rate, thymus et moelle osseuse) et survient par la voie de signalisation extrinsèque incluant les récepteurs Fas/Fas Ligand et Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) et par la voie intrinsèque mitochondriale. Les deux voies aboutissent à l'activation des caspases 3, 8 et 9. Il a par ailleurs été montré que le degré de lymphopénie à J4 après le sepsis était associé à la survenue d'INS et à une mortalité plus importante à un an (Figure 10) (58,59). Dans ce contexte, les potentiels agents thérapeutiques bloquant l'apoptose des lymphocytes ou restaurant leurs capacités prolifératives, tels que l'IL-7 et/ou les anti-PD-1, seraient donc prometteurs (16,60).

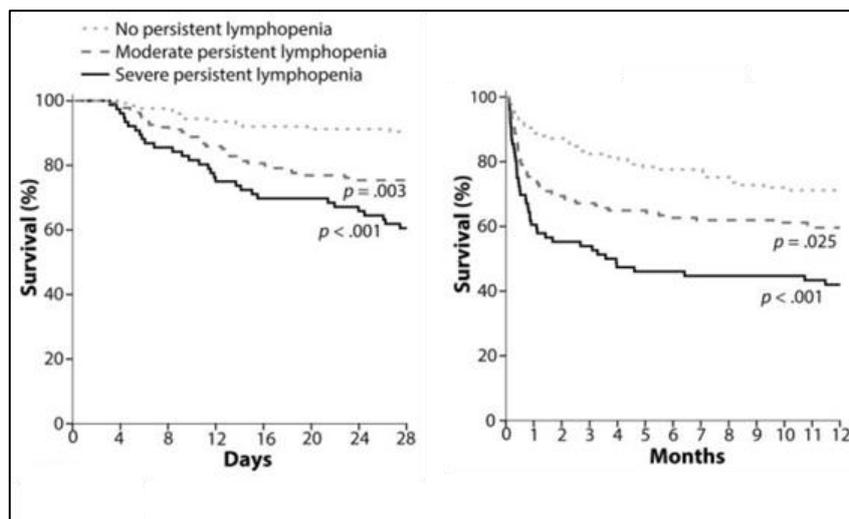


Figure 10 : Lymphopénie circulante et mortalité dans le sepsis. D'après (58)

### 2.3.2.2. Altérations des lymphocytes B

La sous-population lymphocytaire B a été moins décrite que les cellules T dans le choc septique. Récemment, il a été montré que les lymphocytes B subissent une forte apoptose au cours du choc, perdent l'expression de leur marqueur de surface CD19 de surface et ont une capacité de présentation antigénique diminuée manifestée par la baisse de HLA-DR. Ils expriment également plus fortement la combinaison des marqueurs d'épuisement CD21<sup>-</sup>/CD95<sup>+</sup> (61).

### 2.3.2.3. Altérations des lymphocytes T

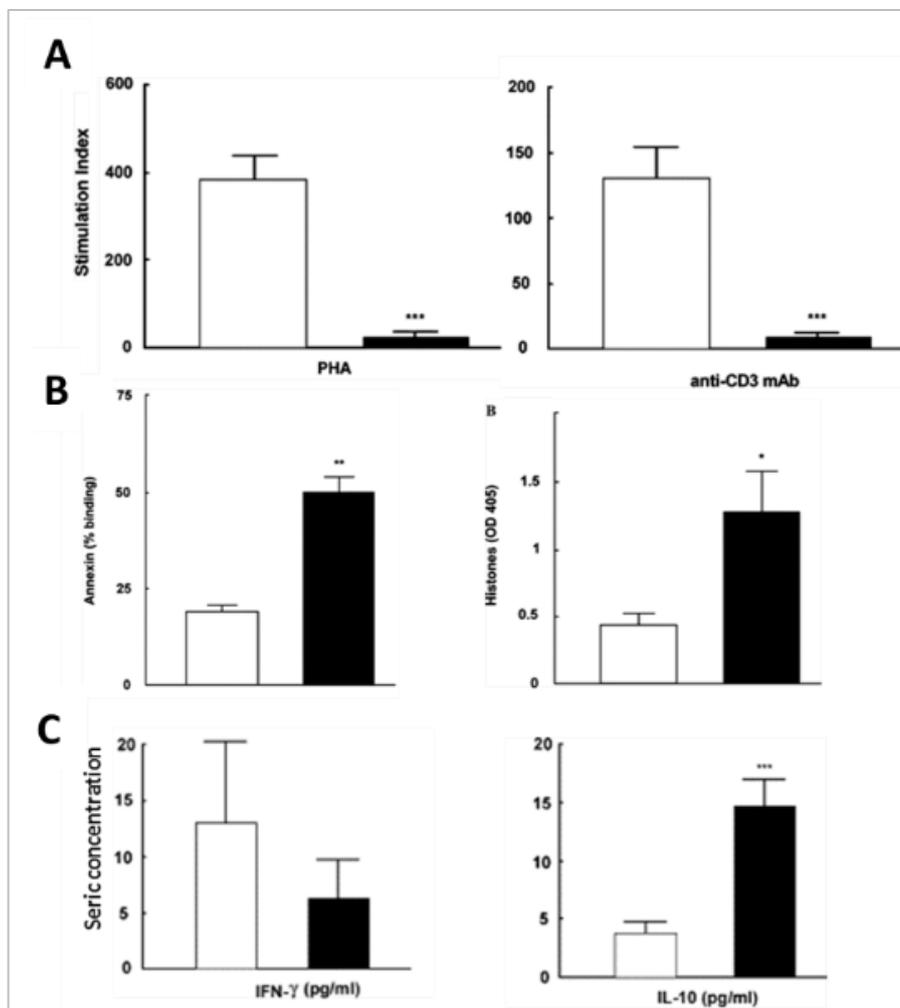
#### ✓ Altérations phénotypiques

Les altérations phénotypiques lymphocytaires T sont nombreuses au cours du choc. On note tout d'abord une diminution de l'expression du CD3 et de la molécule de co-stimulation CD28 en surface (62). Il a également été montré une altération de la diversité du répertoire T jusqu'à J7 après le début du choc, associée à une mortalité plus importante et à la survenue d'infections nosocomiales (63). De plus, les lymphocytes T de patients en choc septique expriment plus les récepteurs inhibiteurs à leur surface, notamment Programmed Death 1 (PD-1), B and T Lymphocyte Attenuator (BTLA), Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4) et T-Cell Immunoglobulin and Mucin-Domain Containing-3 (TIM-3) (62). Leur expression est corrélée à la production d'IL-10 et associée négativement à leur capacité proliférative (64,65).

Enfin, la fréquence des lymphocytes T régulateurs parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup> ou CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) est augmentée en périphérie dans les premiers jours suivant le diagnostic (11), ce qui pourrait être le reflet d'une moindre sensibilité des T<sub>regs</sub> à l'apoptose par rapport aux cellules non régulatrices. L'élévation de leur pourcentage contribue aux altérations lymphocytaires par une augmentation de la réponse régulatrice négative. D'ailleurs, elle est un facteur péjoratif puisque leur proportion reste augmentée entre J5 et J10 après le diagnostic du choc septique chez les patients décédés à J-28 par rapport aux survivants (10,11).

✓ Altérations fonctionnelles et épuisement lymphocytaire T

Par ailleurs, la fonctionnalité des lymphocytes T est altérée comme en témoigne la diminution des capacités prolifératives (66,67), le défaut d'adhésion cellulaire et de polarisation T-helper 2 (23). Une diminution de production des cytokines dites « T-helper 1 » (IL-2 et IFN $\gamma$ ) par les cellules mononuclées du sang périphérique mises en culture a également été démontrée chez les patients atteints d'une infection abdominale sévère (68). Cliniquement, l'anergie lymphocytaire T est illustrée chez les patients septiques par un retard de réponse d'hypersensibilité retardée lors d'une stimulation par un antigène cutané tel que la tuberculine (69).



**Figure 11 : Altérations fonctionnelles lymphocytaires T au cours du sepsis**

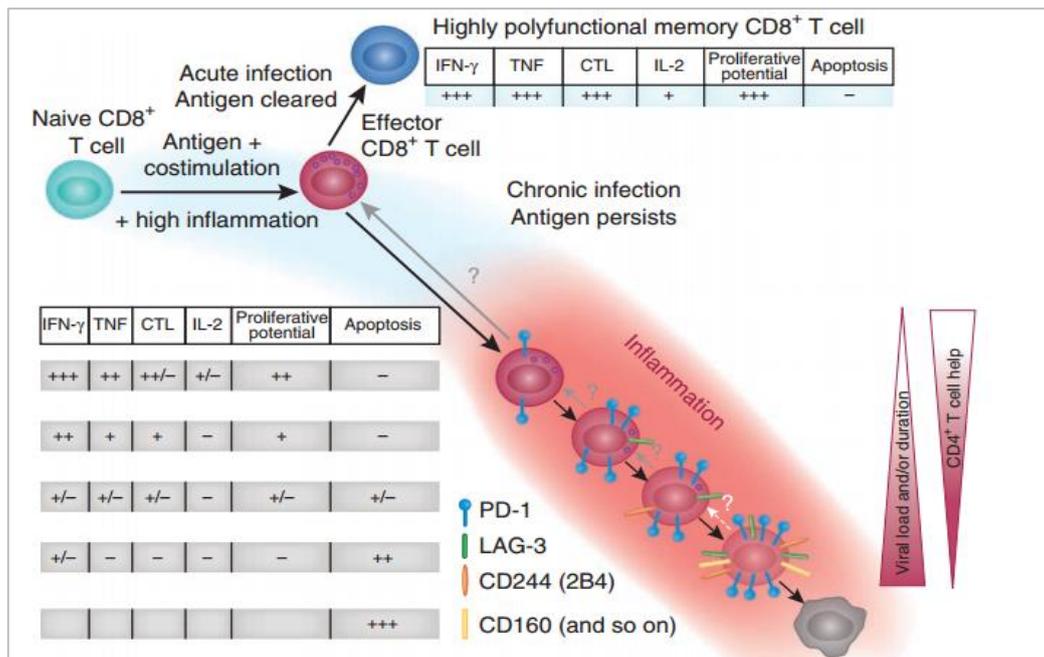
(A) Déficit de prolifération des PBMC de patients septiques par rapport à des sujets contrôles suite à différents stimuli. PHA : phytohemmaglutinine. Anti-CD3 mAb = anticorps monoclonal anti-CD3. (B) Augmentation des marqueurs d'apoptose Annexine V et Histones sur les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> circulants. (C) Baisse de la concentration sérique d'IFN $\gamma$  et augmentation de l'IL-10 chez les patients septiques par rapport à des VS. D'après (56)

Les altérations fonctionnelles précédemment évoquées combinées à l'augmentation d'expression des récepteurs inhibiteurs peuvent être reliées au phénomène d'épuisement lymphocytaire T.

L'épuisement lymphocytaire T ou « T-cell exhaustion » en anglais est un phénomène dans lequel les cellules, principalement les T CD8<sup>+</sup>, perdent progressivement leurs capacités fonctionnelles de prolifération, de production de cytokines, expriment simultanément des récepteurs inhibiteurs à leur surface (PD-1 et son ligand PD-L1, CTLA-4, TIM-3...) et perdent l'expression de récepteurs aux signaux de survie tels que l'IL-7 ou de marqueurs d'appartenance aux tissus lymphoïdes (CD62L) suite une stimulation chronique et répétée par un antigène (Figure 12) (18,70). Il a été décrit pour la première fois en 1998 par l'équipe de Zajac A *et al* (71) comme une déplétion de cellules CD8<sup>+</sup> effectrices dans l'infection chronique au virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) chez la souris et est désormais bien caractérisé dans des modèles animaux et chez l'homme dans les pathologies virales chroniques ou les cancers (18,70,72). Chronologiquement, les fonctions de prolifération cellulaires et la production d'IL-2 sont atteintes en premier, suivi par la perte de production de TNF $\alpha$  et finalement d'IFN $\gamma$  pour aboutir au dernier stade à une déplétion cellulaire (Figure 12).

Dans le sepsis, une dizaine d'études cliniques recensent les altérations d'expression cellulaires des récepteurs inhibiteurs, à la fois sur les monocytes, MDSC et lymphocytes sanguins mais aussi dans les tissus (spléniques, pulmonaires) (73). Elles ont globalement relié ces altérations à un déficit fonctionnel et/ou à un mauvais pronostic clinique.

Le rétablissement des fonctions des cellules T « épuisées », par exemple avec des anticorps monoclonaux anti-PD-1 ou anti-PD-L1, est au cœur des nouvelles thérapies en cancérologie et dans les infections chroniques comme en témoigne le nombre conséquent d'essais cliniques actuellement en cours (74,75) et leur utilisation courante dans le mélanome et le cancer du poumon. Cette approche gagne de l'intérêt dans le sepsis avec de nombreuses études pré-cliniques ou cliniques en cours (73).



**Figure 12 : Développement progressif d'un épuisement lymphocytaire T dans le cadre d'une stimulation antigénique chronique.** D'après (18)

## 2.4. Thérapies immunostimulantes

Depuis les nombreuses avancées dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis, de nouvelles perspectives thérapeutiques sont envisagées. Parmi celles-ci, des thérapies immunomodulatrices visant à rétablir les défenses immunitaires des patients pourraient agir en complément d'un traitement symptomatique et de l'antibiothérapie (7,76). La liste des agents immunomodulateurs actuellement en cours d'essai clinique figure sur le tableau 1. Le G-CSF et GM-CSF sont des facteurs de croissance de la lignée myéloïde et/ou de la lignée myélo-monocytaire. L'Interféron gamma est une cytokine Th-1 qui active les monocytes, augmente leur capacité de présentation antigénique et augmente leur production de cytokines suite à la stimulation par le LPS.

Immune modulator	G-CSF	GM-CSF	IFN- $\gamma$	PD-1 and PD-L1	IL-3	IL-7	IL-15
Proposed benefit	Improves neutrophil and monocyte production and release	Improves neutrophil and monocyte production and function	Improves monocyte HLA-DR expression and function	Biomarkers to identify candidates for immune-modulatory therapy	Promotes stem cell and progenitor development	Increases T cell proliferation and recruitment	Decreases NK cell, T cell, and NKT cell apoptosis
	Improves myelopoiesis and granulopoiesis	Enhances monocytic and lymphocytic cytotoxicity	Reduces infection and related complications	Reverse T cell exhaustion	Enhances lymphopoiesis in combination with IL-7	Decreases lymphocyte apoptosis	Increases NK cell, T cell, and NKT cell proliferation and activation
		Augments T cell responses	Improves immunity against fungal infections	Promote lymphocyte proliferation		Increases T cell IFN- $\gamma$ secretion	
		Reduces nosocomial infection acquisition		Augment neutrophilic and monocytic cytotoxicity		Improves T cell homing and pathogen clearance	
		Reduces ventilator days		Reduce opportunistic infections		Increases T cell receptor diversity	

**Tableau 1 : Traitements immunomodulateurs potentiels et bénéfiques dans le sepsis**  
D'après (7)

Au sein des traitements récemment proposés, les anticorps anti-PD-1 ont été testés dans des modèles murins de sepsis. Les auteurs ont notamment montré une amélioration de la survie, une prévention de l'apoptose des lymphocytes T et des cellules dendritiques (60,77). Deux essais thérapeutiques de phase 2 testant des anticorps anti-PD-1 sont actuellement en cours dans le choc septique (numéros d'essai NC Clinical Trials TO 9960854 et NC TO 2576457).

L'interleukine-7, cytokine indispensable à l'homéostasie des cellules T, est aussi évaluée comme traitement adjuvant dans des contextes lymphopéniques (infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), cancer traité par chimiothérapie, greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)) (78,79) et est également étudiée pour lutter contre la déplétion lymphocytaire dans le sepsis. En effet, dans des modèles murins de péritonite ou d'infection fongique, l'injection d'Interleukine-7 recombinante (rhIL-7) permet une amélioration de l'activité des lymphocytes T, un moindre développement d'INs et un meilleur pronostic (14,16). De plus, l'administration *ex vivo* de rh-IL-7 sur des lymphocytes T de patients septiques induit une augmentation de leur prolifération et des voies de signalisation B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) et Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT-5) (15). Un essai thérapeutique mondial de phase 2 (A Study of RhIL-7 to Restore absolute lymphocyte count in Sepsis patients (IRIS-7)) a eu lieu de janvier 2016 à septembre 2017 pour évaluer l'efficacité de cette immunothérapie adjuvante.

Finale­ment, l'association de l'IL-7 et des anti-PD-1 pourrait être intéressante. Sur un modèle murin de péritonite par ligature et ponction caecale suivi par injection IV de *C. albicans*, il a été montré que les deux agents avaient des effets complémentaires sur la prolifération cellulaire, la production d'IFN $\gamma$  et l'expression de la molécule de co-stimulation CD28 par les lymphocytes par rapport à l'administration d'un seul agent (80).

En l'absence de symptômes cliniques spécifiques d'une immunosuppression, le recours à des marqueurs biologiques d'identification des patients les plus immunodéprimés pouvant bénéficier de ces nouvelles thérapeutiques semble être nécessaire.

# 3. L'interleukine 7 et son récepteur dans le choc septique

## 3.1. Interleukine 7 : origine et structure

L'Interleukine 7 est une cytokine de 25 kDa indispensable à la survie et à l'homéostasie des lymphocytes T. Elle est synthétisée majoritairement par les cellules du stroma épithélial, du thymus et de la moelle osseuse. L'IL-7 appartient à la famille des hématopoïétines de classe 1 regroupant l'IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-9, IL-13, IL-15, le Monocyte CSF et le Stem Cell factor (SCF). Elle a été décrite pour la première fois en 1988 par A.E. Namen, grâce aux travaux de Whitlock en 1987 qui ont démontré l'importance de la présence d'un facteur synthétisé par les cellules stromales à la prolifération des lymphocytes B (81,82). L'IL-7 induit la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en progéniteurs lymphoïdes et la prolifération de toutes les cellules de la lignée lymphocytaire (83). Elle circule en quantité physiologique à des concentrations de 0,3 à 8,4 pg/mL.

## 3.2. Récepteur à l'Interleukine 7

### 3.2.1. Récepteur membranaire (IL-7R $\alpha$ )

L'interleukine 7 agit via un récepteur transmembranaire présent à la surface de la majorité des lymphocytes T matures, des thymocytes et des progéniteurs lymphocytaires B. Le récepteur à l'IL-7 est un hétérodimère composé d'une chaîne  $\gamma$  ou CD132 de 369 acides aminés (AA) commune à d'autres récepteurs de cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 et IL-21) et d'une chaîne  $\alpha$  (ou CD127) de 459 acides aminés spécifique à l'IL-7. L'IL-7R $\alpha$  est composée d'un domaine extracellulaire de 219 AA contenant le site de liaison à l'IL-7, d'un domaine transmembranaire de 25 AA et d'un domaine intracytoplasmique de 195 AA comportant un domaine tyrosine kinase (83).

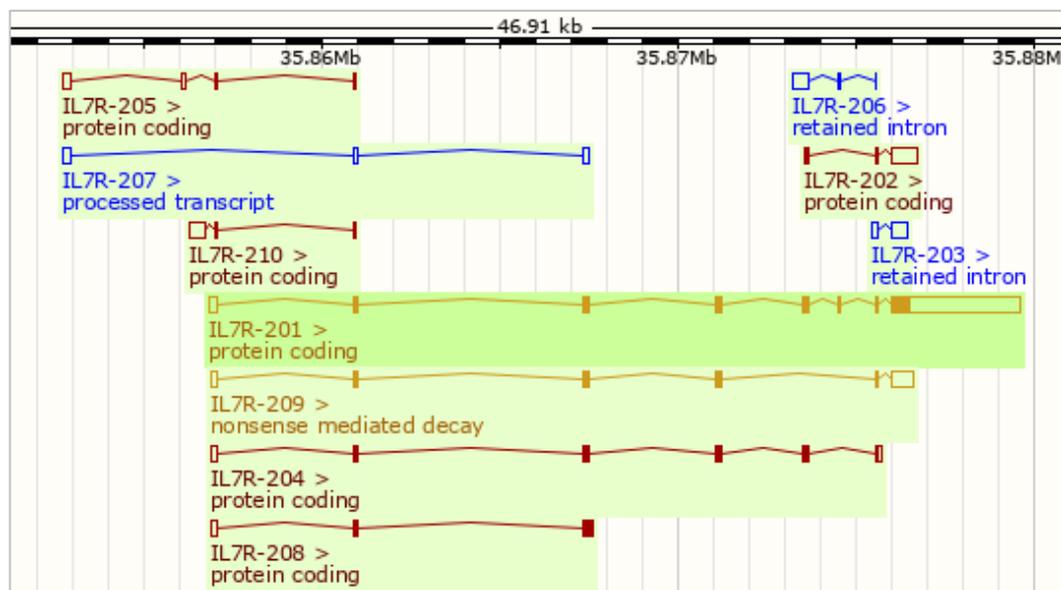
### 3.2.2. Récepteur soluble (sCD127)

Comme évoqué précédemment, une forme sécrétée du récepteur à l'Interleukine 7 ou sCD127 a été décrite (17). Cette protéine de 261 AA peut être synthétisée *de novo* ou produite par clivage du récepteur cellulaire à la membrane (84). Elle aurait des propriétés de rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation de l'IL-7, par la diminution de la phosphorylation de Akt et de Bcl-2 (85). A l'inverse, d'autres travaux lui prêtent des propriétés activatrices. Par exemple, dans la sclérose en plaque (SEP), le sCD127 est en concentration plus élevée dans la circulation des sujets malades par rapport à des VS et il induit une diminution de l'expression de molécules pro-apoptotiques telles que CD95 (Récepteur de Fas) et Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS 1), ce qui augmente le signal de survie médié par l'IL-7. L'hypothèse formulée par les auteurs est que la forme soluble peut capturer l'IL-7 dans le milieu extra-cellulaire pour en limiter sa consommation excessive et libérer la cytokine lorsque celle-ci est en concentration limitée. Elle favoriserait ainsi l'activation de la voie de l'IL-7/IL-7R en condition physiologique (86). En considérant les données actuelles controversées dans la littérature, le rôle précis du récepteur soluble à l'IL-7 reste toujours incertain.

### 3.2.3. Gène de l'IL7R

Le récepteur à l'IL-7 est codé par un gène situé sur le bras court du chromosome 5 (5p13). A ce jour, il existe 10 transcrits correspondants à ce gène référencés sur la base de données « Ensembl Genom Browser » au sein desquels 6 ARN messagers peuvent coder pour une protéine (Figure 13). Parmi ceux-ci, le variant IL7R-1, un ARNm de 4326 pbs, contenant 8 exons, code pour la forme transmembranaire du récepteur, l'exon 6 ayant été identifié comme responsable de la traduction du domaine transmembranaire. A l'inverse, les ARNm ne possédant pas l'exon 6 pourraient potentiellement coder pour une forme soluble. En 1998, l'équipe de Goodwin *et al* a démontré que le variant IL7R-3 contenant 1004 pb permettait la synthèse d'une forme tronquée du récepteur ne possédant pas la partie transmembranaire. Il a aussi montré, par des essais de binding, sa capacité de liaison à l'IL-7 (17). Un autre variant de 612 pb (IL7R-7) ne possédant que les 3 premiers exons pourrait donc aussi être responsable de la synthèse d'une forme soluble.

La transcription du gène de l'IL7R est étroitement régulée au sein des lymphocytes T. En effet, les répresseurs Growth Factor Independent 1 (Gfi-1) ou Forkhead box protein O 1 (Foxo-1) inhibent la transcription du gène dans les lymphocytes T effecteurs après la liaison de l'IL-7 alors que la famille de promoteur Ets, via le recrutement de GABP $\alpha$ , favorise le maintien d'une expression élevée d'IL-7R $\alpha$  sur les cellules naïves et centrales mémoires (87).



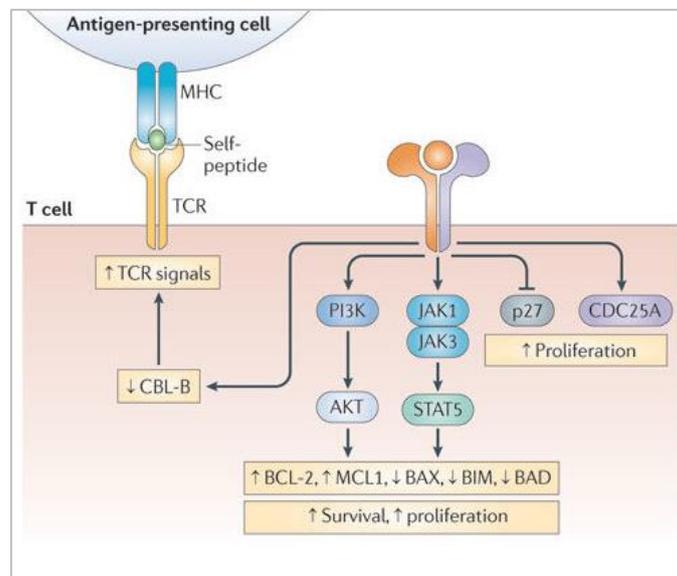
**Figure 13 : Expression des ARNm transcrits du gène de l'IL-7R**  
D'après (88)

### 3.3. Fonctions biologiques de la voie IL-7/IL-7R $\alpha$

Sur les lymphocytes T, après la liaison à son récepteur, l'Interleukine 7 entraîne une hétéro-dimérisation des chaînes spécifiques et communes ce qui induit une cascade de phosphorylations intracellulaires (Figure 14). La première protéine phosphorylée est la protéine Janus-Kinase-3 (JAK-3) puis JAK-1 aboutissant principalement à la phosphorylation des facteurs de transcription STAT-1, 2, 3 et 5. Ceci entraîne leur dimérisation et leur translocation vers le noyau cellulaire où ils peuvent réguler l'expression spécifique de certains gènes. Par exemple, STAT-1 est un répresseur de l'expression des oncogènes c-myc et c-jun et STAT-5 induit l'expression de Bcl-2 et des caspases aboutissant à un fort signal anti-apoptotique.

La voie de signalisation par la Phosphoinositide 3 Kinase (PI3K) est minoritaire par rapport à la voie STAT. À la suite de sa phosphorylation par JAK-1, elle subit une translocation vers la membrane plasmique où elle phosphoryle le substrat lipidique Phosphatidyl Inositol Diphosphate (PIP2) en Phosphatidyl Inositol Triphosphate (PIP3). Ceci permet l'activation de la protéine kinase B (Akt), une sérine/thréonine kinase qui initie le cycle cellulaire et induit le métabolisme par activation du transporteur du glucose GLUT-1 (89,90).

La liaison de l'IL-7 à son récepteur provoque finalement une régulation négative de l'ubiquitine ligase E3 CLB-B qui provoque une augmentation du signal du TCR. Elle induit préférentiellement l'expansion des lymphocytes T naïfs et des récents émergents du thymus ce qui entraîne une diversification du répertoire du TCR (83).



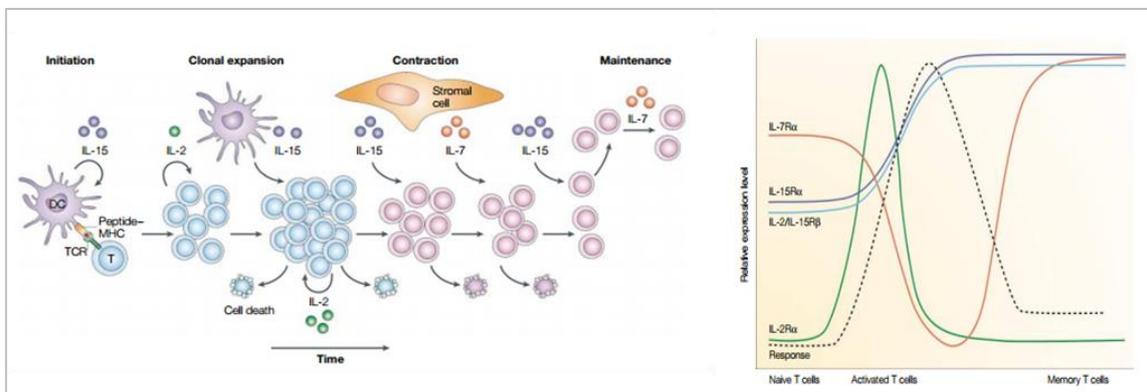
**Figure 14 : voies de signalisation de l'IL-7 après liaison à son récepteur membranaire**

PI3K: Phosphoinositide 3 Kinase, Jak: Janus Kinase, STAT: Signal transducer and activator of transcription, BCL: B-Cell Lymphoma, CDC25A: cell-division cycle 25A, MCL: Myeloid Cell Leukemia, CBL-B Cbl Proto-Oncogene B, BAX: BCL-2 associated-X protein, BIM: Bcl-2-like protein 11 Bcl-2-associated death promoter, BAD. D'après (91)

### 3.4. Régulation du récepteur membranaire en physiologie

#### 3.4.1. Lymphocytes T

Au regard de ses fonctions anti-apoptotiques, l'IL-7 est fortement impliquée dans la survie et le maintien des lymphocytes T. L'expression de son récepteur est ainsi fortement régulée en fonction du stade de maturation (Figure 15). En effet, les cellules naïves récemment émergentes du thymus expriment fortement le récepteur à leur surface. Puis après l'initiation de la réponse, lors de la phase d'expansion clonale, son expression est progressivement diminuée sur les lymphocytes T effecteurs. Leur conservation est alors assurée par le contact prolongé avec l'antigène et par d'autres cytokines de survie : l'IL-2 et l'IL-15 (92). Lors de la phase de contraction clonale, qui permet d'éliminer la grande majorité du pool de cellules effectrices, l'apoptose touche essentiellement une population exprimant de faibles niveaux d'IL-7R $\alpha$ . Celles qui ont maintenu un haut niveau d'expression du récepteur à leur surface (soit 5 à 10% des lymphocytes) ont un avantage de survie et sont identifiées comme les précurseurs des cellules mémoires à long terme avec des facultés de circulation dans les organes lymphoïdes secondaires et de réponse rapide à un nouveau challenge antigénique (91,93).



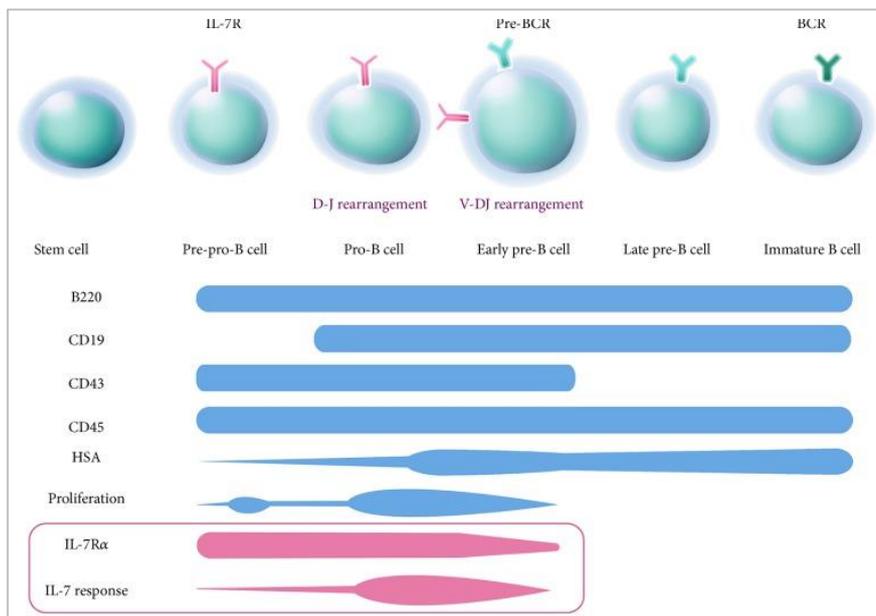
**Figure 15 : Expression du récepteur à l'IL-7 en fonction des stades de maturation lymphocytaires**

D'après (92)

L'expression faible de l'IL-7R $\alpha$  fait partie de la caractérisation phénotypique des lymphocytes T<sub>regs</sub> (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>hi</sup>, FoxP3<sup>+</sup>) contrairement aux lymphocytes TCD4<sup>+</sup> non régulateurs. Sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, l'expression du CD127 est également différente selon le stade maturation et d'activation du lymphocyte T.

### 3.4.2. Lymphocytes B

La voie de l'Interleukine 7 est également importante dans la lymphopoïèse B. Elle promeut la transformation des cellules souches lymphoïdes en progéniteurs de la lignée B. Les cellules pré-pro-B et pro-B expriment ainsi l'IL-7R $\alpha$ , facilitant leur survie, prolifération et maturation en cellules pré-B (Figure 16). L'interleukine 7 agit de pair avec d'autres facteurs de transcription tels que Paired box 5 (Pax-5), Immunoglobulin Enhancer-Binding Factor (E2A) et Early B-Cell Factor 1 (EBF) pour réguler le gène de réarrangement des Ig (RAG). Le récepteur à l'IL-7 est ensuite perdu sur les stades de maturation tardifs des précurseurs B et sur les lymphocytes B matures (94).



**Figure 16 : Expression de l'IL-7R $\alpha$  sur les différents stades de la lignée lymphocytaire B**  
D'après (94)

### **3.5. Implication du récepteur à l'IL-7 en pathologie**

#### **3.5.1. Déficit congénital en IL-7R $\alpha$**

Des mutations dans le gène de l'IL-7R sont responsables de la synthèse d'une protéine non fonctionnelle impliquée dans le développement d'un déficit immunitaire combiné sévère (DICS) T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup>. Il s'agit d'une pathologie rare (1/80 000 naissance) caractérisée cliniquement par des infections récurrentes dans la première année de vie, un retard de croissance et un très mauvais pronostic en l'absence de greffe de CSH. Parmi ces mutations, 3 modifications de la séquence primaire du domaine extra-cellulaire peuvent aboutir à une protéine non fonctionnelle (95).

#### **3.5.2. Sclérose en plaque**

Le gène de l'IL7R est également impliqué dans la progression de la SEP. En effet, un polymorphisme sur le locus 244 du gène induit une augmentation du saut de traduction de l'exon 6, une élévation de la concentration sanguine du récepteur soluble et une diminution du récepteur membranaire. Comme évoqué dans le paragraphe 2.5., l'augmentation de la protéine plasmatique dans la SEP serait responsable d'un stockage plus adéquat de l'IL-7 et *in fine* d'une transduction d'un signal anti-apoptotique plus important participant à l'évolution de la maladie (86).

#### **3.5.3. Epuisement lymphocytaire T**

Nous avons précédemment vu que le récepteur à l'IL-7 était étroitement régulé lors d'une réponse physiologique à une infection. Néanmoins, dans le processus de l'épuisement lymphocytaire tel que décrit dans le paragraphe 2.3.2.3., les cellules dites « épuisées » perdent progressivement leur expression du récepteur à l'IL-7. De nombreuses études en modèle murin (96) ou en situation de stimulation antigénique chronique chez l'homme (cancer du sein, infection chronique au VIH ou au virus de l'hépatite C) (97–99) ont montré une baisse persistante du récepteur à l'IL-7 et une association de cette baisse à une faible clairance antigénique ou à un mauvais pronostic de la pathologie.

Par exemple, la perte du récepteur membranaire a été décrite dans l'infection par le VIH chez les patients en échec immunologique (*i.e.*, les patients avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants <350/mm<sup>3</sup>) par rapport aux patients répondeurs aux anti-rétroviraux (T CD4<sup>+</sup> circulants >350/mm<sup>3</sup>). La diminution de l'expression de l'IL-7R $\alpha$  a été associée à des marqueurs de progression de l'infection (virémie) et d'immunosénescence, (Augmentation de PD-1 et du CD57) (100,101). Par ailleurs, une expression faible de l'IL-7R $\alpha$ , et une augmentation de PD-1 associée à des dysfonctions cellulaires T a été montrée comme étant plus importante chez des patients infectés chroniquement par le virus de l'hépatite C (VHC) que chez des sujets sains (102).

Dans les processus tumoraux solides ou hématologiques, une réduction d'expression de l'IL-7R $\alpha$  a également été rapportée. Par exemple, dans le cancer du sein, la production intracellulaire d'IFN $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> est abaissée chez les patientes par rapport aux sujets contrôles. Les cellules les plus dysfonctionnelles étaient celles qui exprimaient les plus faibles valeurs d'IL-7R $\alpha$  sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (97). Ensuite, dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), les cellules T résiduelles présentent des caractéristiques phénotypiques d'épuisement avec une augmentation de PD-1, de BLIMP-1 et une perte du récepteur à l'IL-7 mais gardent des capacités de synthèse cytokinique (103).

### **3.6. Données dans le choc septique**

Dans le choc septique, l'expression du récepteur à l'IL-7 a été partiellement étudiée. En effet, il a été montré que le récepteur membranaire était abaissé sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de patients entre J1 et J3 après la survenue du choc, associé à une augmentation des concentrations plasmatiques d'IL-7 (15). Par ailleurs, sur une étude *post-mortem* de patients décédés d'un choc septique, l'IL-7R $\alpha$  était diminué sur les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spléniques par rapport à des patient décédés d'une cause non septique (104).

Plusieurs travaux ont également démontré une diminution du récepteur soluble chez les patients en choc septique entre 24h et 48h après le diagnostic et une association entre son augmentation et la mortalité à un mois après le choc (15,105,106). Une étude préliminaire sur les transcrits d'ARNm a aussi montré que plusieurs variants du gène de l'IL7R étaient diminués au cours du choc septique (107).

Néanmoins, l'étude de l'expression de ces différentes formes du récepteur n'est pas complète dans le sepsis. En particulier, elle n'a jamais été réalisée de façon simultanée chez les mêmes patients dans le but d'étudier la régulation des différentes formes les unes par rapport aux autres. De plus, la mesure des transcrits d'ARNm n'a jamais été réalisée isolément sur les principales cellules productrices d'IL7R : les lymphocytes T. Par ailleurs, l'association de son expression avec d'autres marqueurs d'épuisement lymphocytaire, classiquement élevés dans le sepsis tels que les récepteurs inhibiteurs de surface ou une perte fonctionnelle n'a pas été encore établie.

## 4. Conclusion

En conclusion, l'amélioration des connaissances sur la phase immunosuppressive acquise au cours du sepsis a permis, ces dernières années, d'envisager l'utilisation de traitements immuno-adjuvants tels que l'IL-7. Cette cytokine a montré des résultats très prometteurs sur des modèles cellulaires et animaux et a fait l'objet d'un essai thérapeutique multicentrique de phase 2. Cependant, les données de la littérature sur la régulation de son récepteur sont uniquement partielles.

Une étude plus approfondie de ce récepteur est un prérequis nécessaire pour mieux comprendre la régulation de la voie de l'IL-7/IL-7R avant envisager un traitement immunomodulateur par l'IL-7. Il est également intéressant d'étudier le potentiel d'une ou plusieurs forme(s) du récepteur en tant que biomarqueur de stratification des patients éligibles à un tel traitement.

De plus, en considérant le rôle central du récepteur dans l'homéostasie et les fonctions lymphocytaires, et son altération lors du processus d'épuisement cellulaire, il est intéressant de mieux caractériser le rôle de ce récepteur en association à d'autres marqueurs de dysfonction déjà décrits dans le sepsis. C'est dans ce contexte qu'a été initié le projet d'étude de cette thèse qui est exposé dans la partie suivante.



# TRAVAIL PERSONNEL



# 1. Introduction et objectifs

Le choc septique entraîne de profondes altérations du système immunitaire inné et adaptatif à l'origine d'une survenue plus importante d'INs et d'une mortalité plus élevée lorsque que la réponse immunosuppressive prédomine. La meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents et l'identification de biomarqueurs d'identification des patients les plus immunodéprimés sont des axes de recherche fondamentaux pour envisager des thérapeutiques immunostimulantes.

L'interleukine-7, dont nous avons détaillé le rôle crucial dans la première partie de ce manuscrit est actuellement évaluée comme un traitement immuno-adjuvant du sepsis. Cependant, l'étude de son récepteur spécifique demeure incomplète. Notre travail a donc pour premier objectif de caractériser l'expression sur les lymphocytes T de différentes formes de l'IL7R : protéine transmembranaire, récepteur soluble et ARNm, dans le but d'améliorer la compréhension de sa régulation protéique et transcriptionnelle après un choc septique.

Par ailleurs, en considérant l'importance du récepteur à l'IL-7 dans l'homéostasie et la fonctionnalité des cellules T et les données montrant son implication au cours du phénomène d'épuisement lymphocytaire, l'objectif secondaire de notre travail est de mieux définir sa place au sein des altérations lymphocytaires associées au sepsis. Pour cela, nous allons évaluer l'expression du récepteur de surface en combinaison avec d'autres marqueurs phénotypiques et fonctionnels d'activation et d'épuisement cellulaire (PD-1, CD38, HLA-DR et la production intracellulaire de cytokines).

Ce projet a été initié dans le cadre d'un stage de Master 2, en collaboration avec une doctorante (J. Mouillaux) qui a réalisé une étude plus fondamentale de la régulation du récepteur à l'IL-7 en physiologie sur un modèle *ex-vivo*. Il s'inscrit dans un projet global d'étude des dysfonctions lymphocytaires T dans le choc septique mené par l'équipe du Dr Venet au sein de l'équipe d'accueil : 7426 HCL-UCBL1-bMx- « Pathophysiology of Injury Induced Immunosuppression ». Une partie des résultats de ces travaux a fait l'objet d'une communication orale à un congrès français de cytométrie (Cytima, Saint-Etienne, 13 et 14 juin 2017), ont été inclus dans un poster scientifique présenté au congrès annuel de la Société Française d'Immunologie de 2017 (Annexe 1) et dans l'écriture d'un article en cours de préparation pour publication.

Dans la suite du propos, la forme membranaire du récepteur à l'IL-7 sera dénommée indifféremment IL-7R $\alpha$  ou CD127.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Population d'étude et déroulement

Trente et un patients en choc septique (CS) ont été inclus à partir d'une cohorte observationnelle prospective de patients de réanimation appelée « Immunosepsis » (Identification ClinicalTrials.gov : NCT02803346), approuvée par le « comité de protection des personnes ». Les échantillons sont également inclus dans une collection biologique enregistrée au ministère de l'Éducation Supérieure et de la Recherche (#DC-2008-509). Les patients ont été hospitalisés dans les services de réanimation médicale ou chirurgicale de l'hôpital Edouard Herriot de Lyon entre les mois de janvier et juillet 2017. L'inclusion était définie par les critères suivants :

- Site identifiable ou suspecté d'infection
- Hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire nécessitant l'administration d'amines vasoactives (adrénaline ou noradrénaline >0.25 $\mu$ g/kg/mn pendant au moins 2 h après remplissage 30ml/kg)
- Symptômes de SRIS

Les patients étaient exclus selon les critères suivants :

- Age < 18ans
- Déficit immunitaire acquis (Infection par le VIH, cancer traité par chimiothérapie...) ou constitutif
- Traitement immunosuppresseur et/ou corticothérapie (dosage > 10mg/j ou dose cumulative > 700mg en équivalent Prednisolone)
- Aplasie (PNN < 500 cellules/mm<sup>3</sup>)
- Circulation extra-corporelle pendant le mois précédent l'admission

Les échantillons de sang total étaient collectés à 3 temps après le diagnostic du choc septique : de 24 à 48h (J1 n=15), de 72h à 96h (J3 n=30) et de 7 à 8 jours (J7 n=10) ; cet

ensemble représentant un total de 55 échantillons. En parallèle, 34 échantillons sanguins de volontaires sains (VS) ont été récoltés à partir de prélèvements issus de donneurs de sang à « l'Etablissement Français du Sang » (EFS). Nous avons sélectionné uniquement des donneurs d'âge supérieur ou égal à 50 ans, selon les contraintes de l'EFS pour correspondre le plus possible à la tranche d'âge des patients en CS. Tous les tests biologiques ont été réalisés à partir d'échantillons de sang total prélevé sur des tubes contenant de l'EDTA ou de l'héparine comme anticoagulant.

## **2.2. Cytométrie en flux**

### **2.2.1. Marquages de surface**

Tous les marquages de cytométrie en flux ont été réalisés à partir de 50µL de sang total dans les heures suivant le prélèvement sanguin. Les anticorps monoclonaux ont été fournis par la société Beckman Coulter selon les modalités suivantes : CD4 Pacific Blue (PB), CD8 Krome Orange (KRO), CD127 Allophycocyanin (APC), CD25 Phycoerythrin-Cyanin 7 (PC-7), CD45RA Phycoerythrin (PE), CD3 PC-7 et par R&D systems : CCR7 Fluorescein isothiocyanate (FITC), CD107a FITC. La valeur du nombre de site mHLA-DR a été déterminée selon un protocole déjà établi au laboratoire (48).

Les globules rouges ont ensuite été lysés par une solution de Versalyse (Beckman Coulter). Un contrôle isotypique a été utilisé pour les anticorps anti-CD127 et anti-PD-1. Les cellules ont été fixées à la dernière étape du marquage avec un tampon contenant 1% de formaldéhyde. Tous les protocoles de cytométrie ont été réalisés sur un cytomètre Navios (Beckman Coulter) et les données ont par la suite été analysées avec le logiciel de traitement des données Kaluza Analysis Software 1.2 (Beckman Coulter). La stabilité des mesures en MFI a été contrôlée par le passage régulier de billes de standardisation sur le cytomètre (Rainbow Calibration Particles, 8 peaks) dans le protocole dédié. Les globules blancs et les lymphocytes ont été sélectionnés sur un histogramme taille/structure (FSC/SSC). La détermination des valeurs absolues a été réalisée par l'ajout de billes fluorescentes de calibration (Flow-count Fluospheres Beckman Coulter). Un minimum de 1500 éléments dans chaque fenêtre d'intérêt a été acquis lors de la lecture du protocole sur le cytomètre. Les résultats ont été exprimés en Médiane d'Intensité de Fluorescence (MFI), qui reflète le niveau d'expression du marqueur à la surface cellulaire ou en pourcentage de cellules positives pour un marqueur parmi la population sélectionnée.

## 2.2.2. Mesures fonctionnelles

Pour les mesures fonctionnelles, 50µL de sang hépariné ont été activés par un cocktail de stimulants non spécifiques : phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et ionomycine, lyophilisés au fond d'un tube issu d'un kit commercial (tube d'activation « DurActiv », Immunotech, Beckman Coulter Marseille). La PMA stimule directement les voies intracellulaires et notamment la protéine kinase C sans passer par une stimulation complète du TCR. L'ionomycine est un ionophore du calcium utilisé en addition pour déclencher la libération de calcium, indispensable aux voies de signalisation intracellulaires. Il contient aussi de la bréfeldine A, un agent bloquant la sécrétion protéique hors du Golgi, assurant une spécificité intracellulaire du marquage. Un tube de sang non stimulé servant de contrôle négatif a été réalisé en parallèle. Pour exprimer les résultats, la région de positivité dans la condition stimulée a été sélectionnée en prenant en compte la région correspondant à 0,5% de la population totale dans la condition non stimulée.

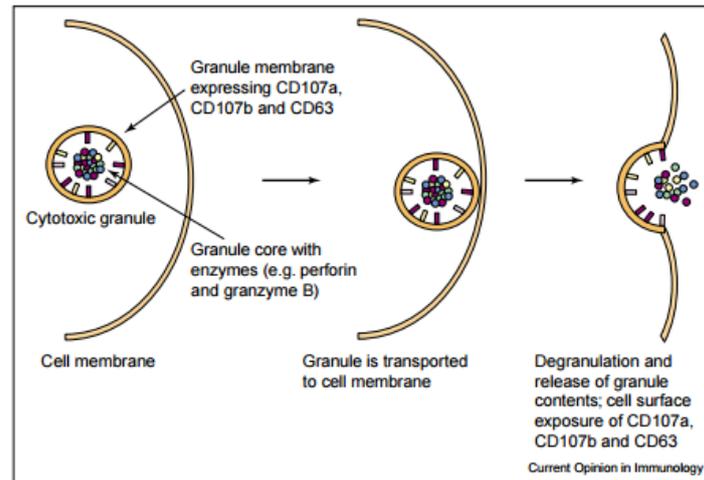
### 2.2.2.1. Cytokines intracellulaires

Après avoir été activé pendant 3H à 37°C, le sang a été marqué par le mélange d'anticorps lyophilisés (tubes commerciaux « Duraclone » (Immunotech, Beckman Coulter Marseille) contenant les anticorps suivants : CD3 Alexa Fluor 750 (AF750), CD4-PB, CD8-AF700, IFN $\gamma$ -FITC, TNF $\alpha$ -PE and IL2-PC7). Par la suite, le marquage intracellulaire a été réalisé avec le kit de perméabilisation « PerFix-nc no centrifuge » (Beckman Coulter) qui contient un réactif perméabilisant la membrane cellulaire et lysant simultanément les globules rouges.

### 2.2.2.2. Capacités de dégranulation des T CD8<sup>+</sup>

Les capacités cytotoxiques des lymphocytes TCD8<sup>+</sup> ont été évaluées par la mesure de l'expression du CD107a membranaire. Ce marqueur est physiologiquement présent dans les granules cytotoxiques intracellulaires et est uniquement exprimé à la membrane du lymphocyte lors de la dégranulation (Figure 17). L'anti-CD107a FITC (R&D systems) a été ajouté directement sur sang total avant la phase de stimulation. Après la période d'activation de 3H, les autres anticorps : CD3 PC-7, CD127 APC et CD8 KRO ont été additionnés. Un tube contrôle

non stimulé a également été réalisé en parallèle. Les globules rouges ont par la suite été lysés par une solution de Versalyse et après plusieurs lavages, la suspension cellulaire a été fixée par une solution contenant 1% de formaldéhyde.



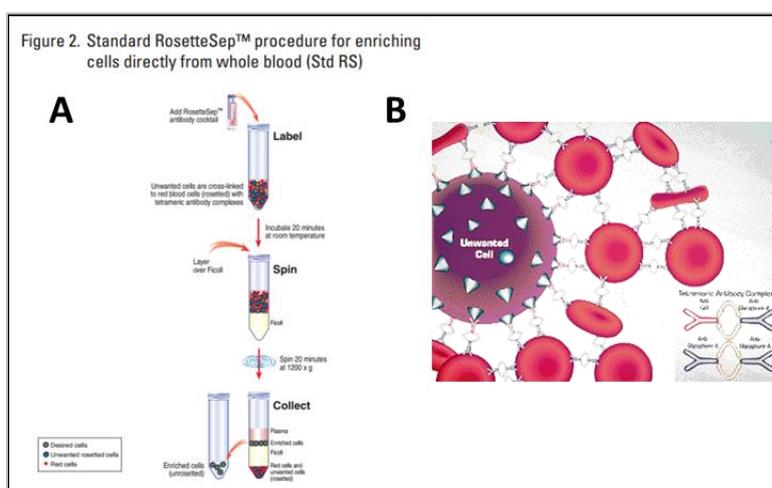
**Figure 17 : Expression des marqueurs dans les granules cytotoxiques des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**  
D'après (108)

### 2.3. Purification des lymphocytes T

Les lymphocytes T ont été isolés à partir d'échantillons de sang total grâce à une purification par gradient de densité (en milieu Ficoll) et par l'utilisation du réactif RosetteSep Human T cell enrichment cocktail (Stemcell). Ce réactif cible les cellules non-T avec des anticorps spécifiques puis les cellules indésirables reconnues sont agrégées à la fois entre elles et avec des globules rouges, formant des immunorosettes (Figure 18). Ces agrégats de forte densité sont collectés au fond du tube avec les globules rouges libres après l'étape d'ajout de Ficoll et de centrifugation. Les cellules T ne sont captées par aucun anticorps et forment un anneau de cellules purifiées à l'interface entre le plasma et le Ficoll. Après 20 minutes d'incubation avec le réactif RosetteSep, une centrifugation en gradient de densité est réalisée. Puis, après des étapes de lavage, les lymphocytes T ont été récupérés dans un tampon de conservation pour des analyses de biologie moléculaire (RLT Buffer, Qiagen) contenant 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol et conservées à -20°C. Le compte cellulaire a été établi avec des billes fluorescentes Flow-Count (Beckman Coulter) ainsi qu'avec un marqueur fluorescent

intercalant (le LDS 751). La pureté, correspondant au nombre de cellules CD3<sup>+</sup> parmi tous les éléments isolés, a été mesurée avec un anticorps anti-CD3 PC-7.

Le compte médian de lymphocytes T extraits après l'étape de Ficoll était de 505 000 cellules/mm<sup>3</sup> pour les échantillons de patients *versus* 1 211 500/mm<sup>3</sup> pour les contrôles. Les données brutes d'extraction figurent en annexe 2. La pureté moyenne correspondant au pourcentage de cellules CD3<sup>+</sup> était de 82%, le pourcentage de cellules vivantes (LDS<sup>+</sup>) parmi toutes les cellules extraites était de 90%.



**Figure 18 : Enrichissement cellulaire par le réactif RosetteSep**

(A) Procédure de purification et de récolte de l'anneau cellulaire purifié. (B) Agrégation des cellules non désirées sous forme de Rosette.

## 2.4. Mesure des ARNm de l'IL7R

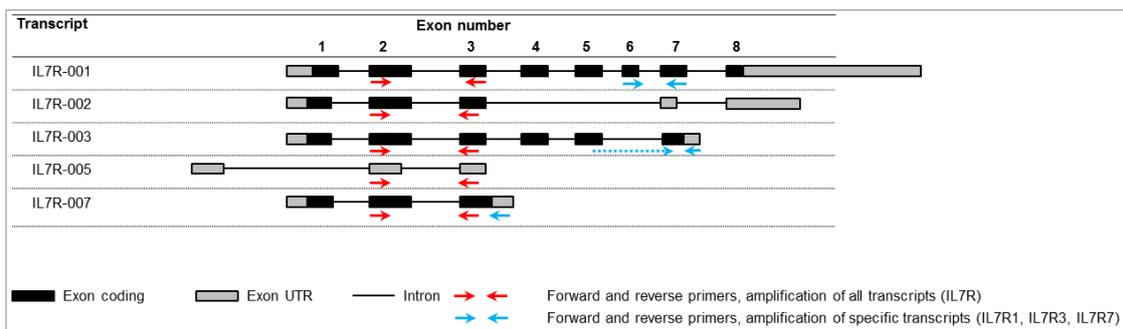
L'ARN total a été extrait des échantillons de cellules T purifiées avec le kit RNeasy plus Micro Kit (Qiagen), et quantifié à l'aide du kit Qubit RNA HS assay (ThermoFisher) sur un Fluorimètre Qubit (HTDS). La quantité d'ARN total introduit dans la réaction de rétro-transcription a été normalisée à 100ng. La qualité de l'ARN a ensuite été vérifiée par la détermination du RNA integrity number (RIN) sur des puces Agilent RNA 6000 (Agilent technologies). Puis, l'étape de rétro-transcription a été réalisée par l'utilisation d'une rétro-transcriptase Superscript Vilo (Invitrogen). Enfin, les PCR quantitatives ont été effectuées à

partir de l'ADN complémentaire rétro-transcrit. Quatre couples d'amorces de PCR ont été conçues pour étudier l'expression du gène du CD127 (Figure 19) parmi lesquels :

- Un s'hybridant avec les exons 2 et 3 permettant la détection des variants d'épissage IL7R-001, IL7R-002, IL7R-003, IL7R-005 et IL7R-007
- Un s'hybridant avec les exons 6 et 7 ciblant le transcrite transmembranaire (IL7R-001)
- Un couple d'amorce contenant une séquence à cheval entre les exons 5 et 7, ne pouvant s'hybrider qu'en cas d'une excision de l'exon 6 et correspondant au transcrite IL7R-003
- Un dernier s'hybridant avec l'exon 2 et une région de l'exon 3 spécifique du variant IL7R-007

Quatre PCR ciblant des gènes de référence ont également été effectuées. Les gènes sélectionnés étaient : Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT-1), RAN Binding Protein 3 (RANBP-3), Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (PPIB) et Glyoxylate Reductase 1 Homolog (GLYR-1). Les résultats ont été représentés sous forme de ratio par rapport à l'expression d'un gène de référence sélectionné parmi les 4 gènes comme le moins variable dans le choc septique : HPRT1. L'expression des gènes de référence figure en annexe 2.

Les PCR quantitatives ont été réalisées sur un instrument Lightcycler 480 (Roche) avec le kit Taqman Fast Advanced Master Mix PCR standard (Roche) selon les instructions du fabricant. Une courbe de calibration a été réalisée pour chaque couple de primer/sonde afin de pouvoir quantifier le nombre exact de copies d'ADN rétro-transcrit.



**Figure 19 : Localisation des amorces PCR communes et spécifiques à chaque transcrite du gène de l'IL7R**

## 2.5. Dosage du CD127 soluble

La concentration plasmatique du CD127 a été mesurée par une technique « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay » (ELISA) sandwich, selon un protocole adapté d'un protocole déjà réalisé sur une large cohorte de patients (105). L'anticorps de capture anti-CD127, clone R34.34 (Beckman Coulter) a été déposé pendant une nuit dans une plaque 96 puits. Puis après une étape de lavage au TBS-Tween (3,3',5,5'-tétraméthyl-4,4'-biphényldiamine-Tween) 0,05%, les puits ont été saturés par du TBS-Tween contenant 10% de sérum de chèvre et lavés à nouveau. Les échantillons plasmatiques dilués au 1/8 ainsi qu'une gamme standard établie par dilution d'une solution mère de protéine recombinante purifiée (CD127 Fc chimera protein) ont été déposés puis incubés 2h à 37°C. Les puits ont ensuite été lavés à nouveau puis une seconde incubation de 2h à 37°C a été réalisée avec l'anticorps secondaire polyclonal biotinylé BAF 306 (R&D systems). La détection du complexe sCD127/Anti-sCD127 a par la suite été réalisée par une réaction streptavidine (SA-HRP) biotine puis par une révélation au TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, Pierce ThermoFisher scientific). La réaction a enfin été stoppée par l'ajout d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à la concentration de 2 mol/L. L'absorbance a été lue sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm.

## 2.6. Analyses statistiques

Les représentations graphiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism V5. Les résultats sont présentés sous forme de box plot avec une barre représentant la médiane et deux barres pour les 1<sup>ers</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles. Des tests non paramétriques de Mann-Whitney ont été effectués pour comparer les résultats. Des corrélations ont été réalisées en calculant le coefficient non paramétrique « r » de Spearman. Une p-value ≤ 0,05 a été considérée significative. Une analyse non supervisée des fichiers de cytométrie a été réalisée via l'utilisation de la plateforme en ligne Cytobank (<https://www.cytobank.org/>) selon l'algorithme de Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events (SPADE).

## 3. Résultats expérimentaux

### 3.1. Cohorte d'étude, caractéristiques cliniques et biologiques

Nous avons inclus 31 patients en CS à différents temps après le diagnostic et 34 VS. Cet effectif a été divisé en deux groupes correspondant à deux séries de manipulations: le premier de 21 CS et 20 VS et le deuxième de 17 CS et 14 VS, 7 patients étant communs aux deux groupes.

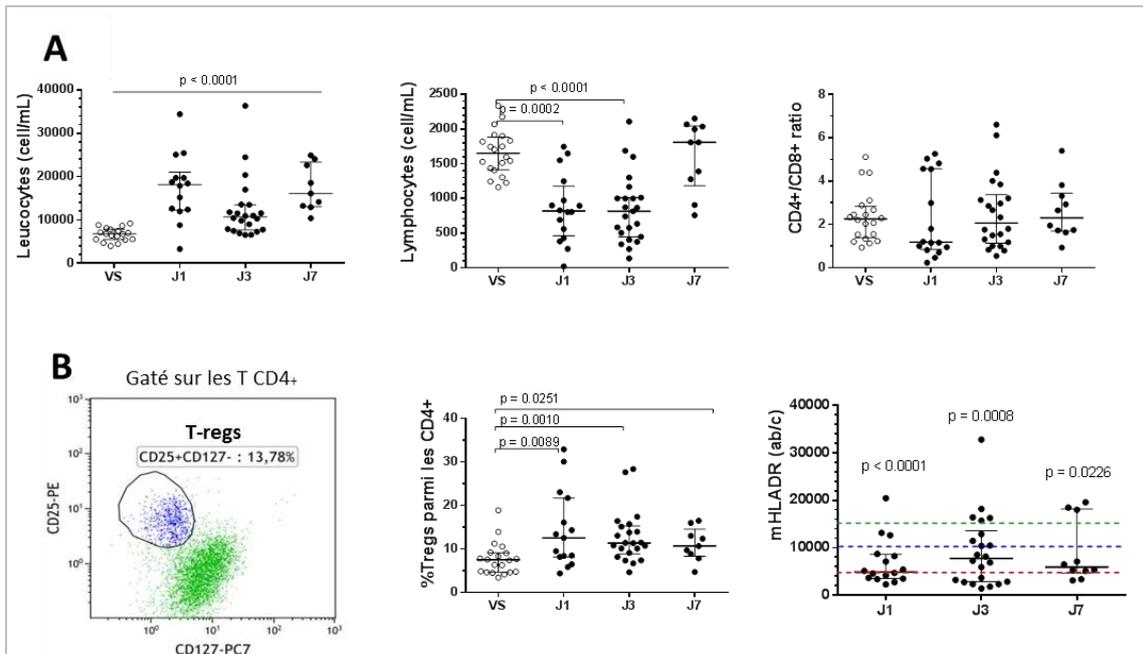
Les données clinico-biologiques de la population d'étude sont résumées dans le tableau 2. L'âge médian des patients en CS était de 69 ans *versus* 56 ans pour les VS. Le sexe-ratio Homme/Femme pour les patients était de 59% et de 69% chez les VS. Le score de gravité IGS II médian des patients septiques était de 59 et le SOFA de 9. La mortalité à J28 post-admission était de 24%, ce qui est faible par rapport aux données attendues pour une cohorte comparable. Un patient en CS a développé une IN.

Variable	Valeur
<b>Sexe, homme</b>	13 (59%)
<b>Age, années</b>	75 [64-78]
<b>Scores cliniques</b>	
IGS II	59 [47-74]
SOFA*	9 [7-11]
<b>Score de comorbidités de Charlson</b>	
0	4 (14%)
1	13 (45%)
> 1	12 (41%)
<b>Durée médiane du séjour en réanimation (j)</b>	10 [3-17]
<b>Score Mac-Cabe au diagnostic</b>	
1-Non fatal	20 (69%)
2-Issue fatale	7 (24%)
3-Rapidement fatale	2 (7%)
<b>Type d'admission</b>	
Médicale	18 (63%)
Chirurgie urgente	10 (34%)
Chirurgie programmée	1 (3%)
<b>Infection initiale</b>	
Abdominale	11 (38%)
Liée au cathéter	6 (20%)
Urinaire	4 (14%)
Peau et tissus	2 (7%)
Gastro-intestinale	2 (7%)
Autre	4 (14%)
<b>Documentation microbiologique</b>	
Bacille Gram Négatif	7 (24%)
Cocci Gram Positif	8 (28%)
Autre	1 (3%)
Non documenté	12 (41%)
<b>Type d'infection</b>	
Communautaire	16 (55%)
Nosocomiale	13 (45%)
<b>Mortalité à 28 jours</b>	7 (24%)
<b>Développement d'infection(s) nosocomiale(s)</b>	1 (3%)

**Tableau 2 : Données cliniques et démographiques des patients en CS**

Les variables continues sont présentées en médiane [IQR]. Les effectifs ou variables catégorielles sont présentées en nombre de cas avec le pourcentage entre parenthèse. SOFA : Sequential Organ Failure Assessment, IGS II : « Indice de Gravité Simplifié » ou SAPII : « Simplified Acute Physiologic Score ». \* Pour le calcul du SOFA, il y avait des données manquantes (notamment la bilirubine) pour 3 des 29 patients inclus le score a donc été estimé pour ces 3 patients.

Les données biologiques sont résumées sur la figure 20. Par rapport aux VS, les patients présentent des caractéristiques classiques de patients en CS à savoir une hyperleucocytose, une lymphopénie à J1 et J3, une augmentation du pourcentage de T<sub>regs</sub> et une chute du mHLA-DR monocytaire. En revanche, le ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> parmi les lymphocytes totaux est comparable aux valeurs des VS indiquant que la déplétion en lymphocytes circulants affecte les sous-populations T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de façon équivalente.



**Figure 20 : Données biologiques des patients en CS en comparaison aux données contrôles**

(A) Comparaison de la leucocytose, de la lymphocytose et du ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> entre les VS (n=20) et les patients en CS à J1 (n=14), J3 (n=29) et J7 (n=10). (B) Exemple de sélection des T<sub>regs</sub> (gauche), déterminé selon le pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Comparaison des pourcentages de T<sub>regs</sub> entre les VS (n=20) et les patients à J1 (n=14), J3 (n=22) et J7 (n=10) et des niveaux de mHLA-DR entre les données des patients et les valeurs de référence du laboratoire (15 000 < mHLA-DR < 10 000 : immunodépression modérée, entre 10 000 < mHLADR < 5000 sites : immunodépression marquée, mHLA-DR < 5000 sites : immunodépression sévère).

## 3.2. Régulation du récepteur à l'IL-7

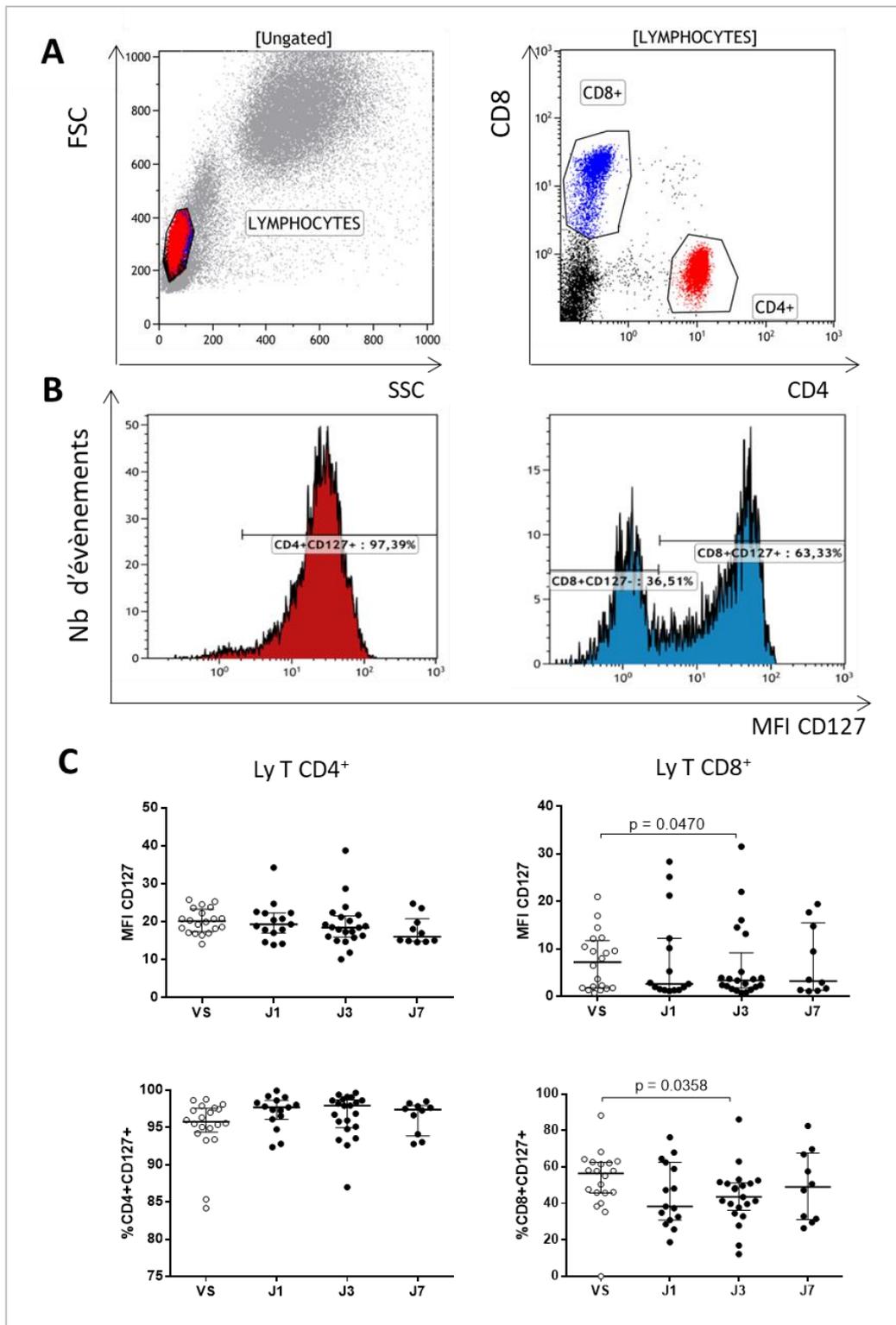
### 3.2.1. Régulation du récepteur membranaire

#### 3.2.1.1. Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>

Nous avons dans un premier temps mesuré l'expression du récepteur membranaire à l'interleukine-7 (IL-7R $\alpha$  ou CD127) sur des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de patients en CS par cytométrie en flux. La stratégie de sélection des populations cellulaires est présentée sur la figure 21. Par rapport au contrôle isotypique, plus de 95% de la population T CD4<sup>+</sup> exprime le CD127. En revanche, sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, on note l'existence d'une sous-population exprimant faiblement le récepteur à l'IL-7 à sa surface (CD127<sup>low</sup>) et d'une sous-population l'exprimant fortement (CD127<sup>hi</sup>) (Figure 21.B).

Lorsque l'on compare la MFI globale du CD127 (Figure 21.C), l'expression du récepteur à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est stable mais on note une diminution sur les T CD8<sup>+</sup> à J3 après le diagnostic du choc. En considérant le pourcentage de cellules T CD8<sup>+</sup> exprimant le CD127, on a aussi une diminution de leur proportion à J3 ce qui explique probablement la baisse d'expression du récepteur sur toute la population T CD8<sup>+</sup> en MFI globale.

Ainsi, ces résultats ne semblent pas montrer de régulation directe du récepteur à la membrane cellulaire des T CD8<sup>+</sup> mais plutôt une diminution de la proportion de cellules exprimant le récepteur.



**Figure 21 : Expression du CD127 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>**

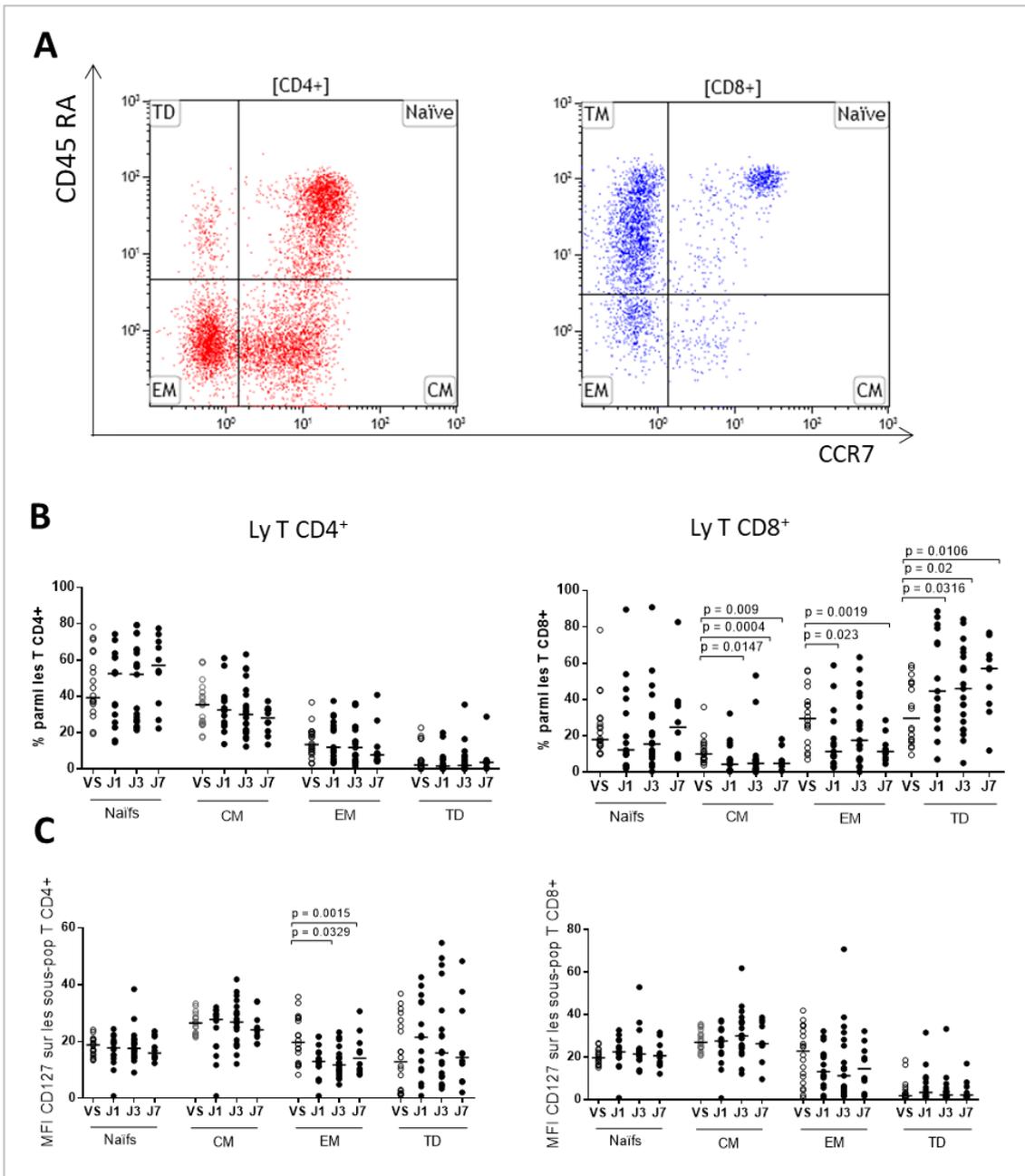
(A) Stratégie de sélection des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> à partir des globules blancs totaux. (B) Exemple représentatif de l'expression du CD127 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> d'un patient en CS. (C) Expression du récepteur à l'IL-7 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> chez les VS (n=20) et les patients à J1 (n=15), J3 (n=21) et J7 (n=10). Pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> exprimant le récepteur à l'IL-7 chez les VS (n=20) et les patients à J1 (n=15), J3 (n=21) et J7 (n=10).

### 3.2.1.2. Sous-populations naïves et mémoires

Dans un second temps, nous avons sélectionné quatre sous-populations cellulaires correspondant à des stades de maturation différents basés sur l'expression des marqueurs phénotypiques de l'isoforme RA du CD45 et sur le CCR7, récepteur de chimiokine marquant l'appartenance au ganglion lymphatique. Les cellules CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> correspondent à des cellules naïves circulantes produites par le thymus. Lors d'une première reconnaissance antigénique, le contingent lymphocytaire acquiert des propriétés de mémoire immunitaire. Parmi les cellules mémoires, on distingue les lymphocytes T centraux mémoires (T<sub>CM</sub>) avec un phénotype CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup> qui perdent l'expression de l'isoforme CD45RA au profit du CD45RO. Elles acquièrent en même temps des capacités prolifératives importantes et constituent une réserve pour la génération de nouvelles cellules T effectrices en cas de ré-exposition à l'antigène. La présence du CCR7 leur confère la capacité de domiciliation aux organes lymphoïdes secondaires, lieu de rencontre avec les cellules présentatrices d'antigènes (109).

Les cellules effectrices mémoires (T<sub>EM</sub>) qui ont un phénotype CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup> sont quant à elles les acteurs essentiels de la réponse antigénique. Elles peuvent répondre rapidement en cas d'infection grâce à leurs propriétés prolifératives importantes et à leur capacité de synthèse de cytokines. Finalement, les cellules effectrices mémoires RA<sup>+</sup>, ou cellules de différenciation terminale (T<sub>TD</sub> ou T<sub>EMRA</sub>) sont CCR7<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup> ont également des capacités effectrices immédiates mais une faible capacité de prolifération. Ces cellules sont majoritairement retrouvées au sein des CD8<sup>+</sup> chez l'adulte et le sujet âgé.

Nous avons évalué la proportion de ces quatre différents stades de maturation T chez les patients en CS en comparaison aux VS ainsi que l'expression du CD127 au sein de chacune d'entre elle. La stratégie de sélection cellulaire est présentée sur la figure 22.A.



**Figure 22 : Répartition des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïfs et mémoires et expression du CD127**

(A) Exemple de la répartition des sous-populations basée sur l'expression des marqueurs CD45RA et CCR7 sur les CD4<sup>+</sup> (gauche) et CD8<sup>+</sup> (droite) chez un VS. Les cellules naïves sont CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>, et les cellules mémoires ont été classées en 3 groupes : centrales mémoires (CM, CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>), effectrices mémoires (EM, CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>), et différenciées terminales (TD, CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>). (B) Pourcentages des sous-populations et (C) Expression du CD127 dans les quatre sous-populations parmi les CD4<sup>+</sup> (gauche) et CD8<sup>+</sup> (droite) chez les VS (n=20) et les patients à J1 (n=15), J3 (n=21) et J7 (n=10).

Les résultats montrent une variabilité inter-individuelle importante de la répartition des sous-populations, à la fois pour les VS et les patients (Figure 22.B). Malgré cela, sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, on ne met pas en évidence de différence significative de la proportion entre les populations naïves et mémoires. En revanche, sur les T CD8<sup>+</sup> on observe une diminution du pourcentage de cellules T<sub>CM</sub> de J1 à J7 et T<sub>EM</sub> à J1 et J7 associée à une augmentation des cellules T<sub>TD</sub> à tous les temps après le diagnostic du CS.

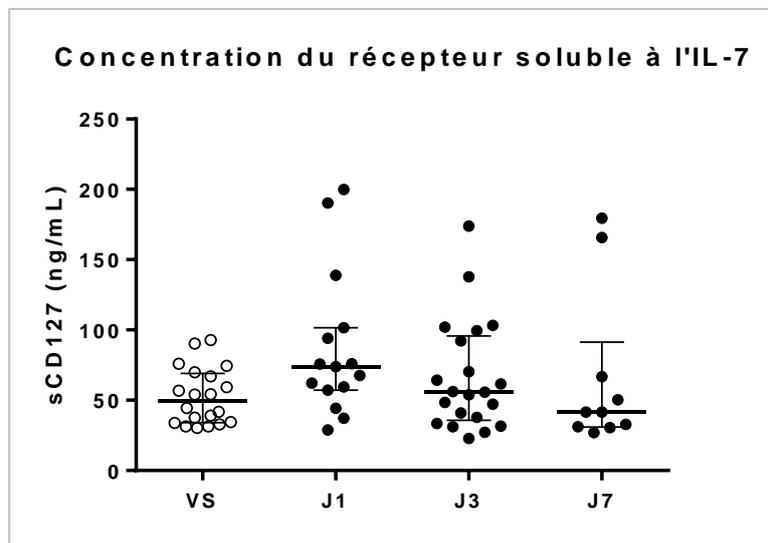
Par ailleurs, on remarque que les cellules T CD8<sup>+</sup> T<sub>TD</sub> ont de faibles MFI du récepteur à l'IL-7 à la fois chez les VS et les patients en CS (Figure 22.C). L'augmentation du pourcentage cette sous-population parmi les T CD8<sup>+</sup> totaux peut donc partiellement expliquer la diminution d'expression du CD127 sur les CD8 décrite dans le paragraphe 3.2.1.1. (Figure 21.C).

En revanche, le niveau d'expression du récepteur à la surface cellulaire, représenté par la MFI est diminué sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs mémoires à J1 et J7 (Figure 22.C). Etant donné que les lymphocytes T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> représentent une faible proportion de l'effectif total, (environ 15% selon la figure 22.B), cette perte apparente ne se reflète pas lorsque l'on mesure la MFI du CD127 sur tous les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Figure 21.C).

Finalement, excepté sur une sous population mineure de T CD4<sup>+</sup>, le niveau d'expression de l'IL-7R $\alpha$  est globalement maintenu en MFI à la surface des lymphocytes T des patients après un CS (Figure 22.C).

### 3.2.2. Régulation de la protéine soluble

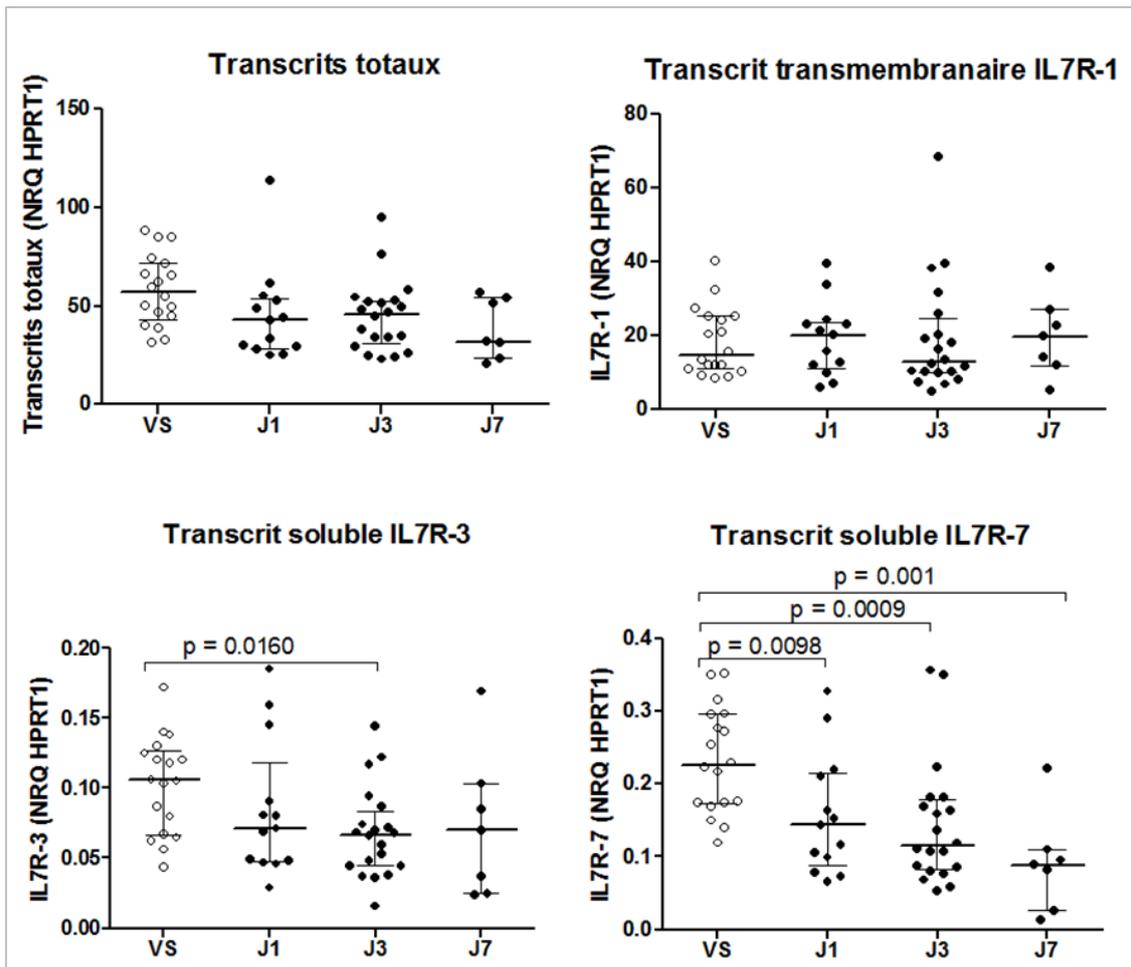
Nous avons ensuite dosé la forme soluble du récepteur à l'IL-7 (sCD127) dans le plasma des patients atteints de CS (Figure 23). Contrairement à des données déjà publiées dans la littérature, nous ne notons pas de diminution de la concentration de cette forme chez les patients. En revanche, des expériences complémentaires réalisées dans l'équipe ont permis de mettre en évidence une augmentation du relargage du récepteur soluble à partir de lymphocytes T purifiés après 48H de culture (Annexe 3).



**Figure 23 : Concentration plasmatique (ng/mL) du récepteur soluble à l'IL-7**  
Expression chez les VS (n=20) et les patients en CS à J1 (n=15), J3 (n=21) et J7 (n=10)

### 3.2.3. Régulation des ARN messagers sur les lymphocytes T purifiés

Nous avons évalué par RTqPCR l'expression de plusieurs ARNm du récepteur à l'IL-7, à partir d'isolats de lymphocytes T purifiés de patients en CS. En particulier, nous avons mesuré le transcrite IL7R-1 codant pour le récepteur transmembranaire et deux ARNm ne possédant pas l'exon 6, les formes IL7R-3 et IL7R-7 (Figure 13). L'IL7R-3 a démontré sa capacité de synthèse d'une forme soluble du récepteur (17), et l'ILR-7, de par sa structure pourrait également être traduit en protéine sécrétée.



**Figure 24 : Expressions des ARNm de l'IL7R normalisée par l'expression du gène de référence HPRT1**

L'expression de 4 types de transcrits ARNm a été mesurée chez les VS (n=18) et les patients en CS à J1 (n=13), J3 (n=20) et J7 (n=7). Quatre couples d'amorces ont été élaborés : un couple pour les transcrits totaux, un pour le transcrite majoritaire transmembranaire IL7R-1, un pour le transcrite soluble IL7R-3 et un dernier pour un variant ne possédant pas l'exon 6 et ainsi codant potentiellement pour une forme soluble, IL7R-7.

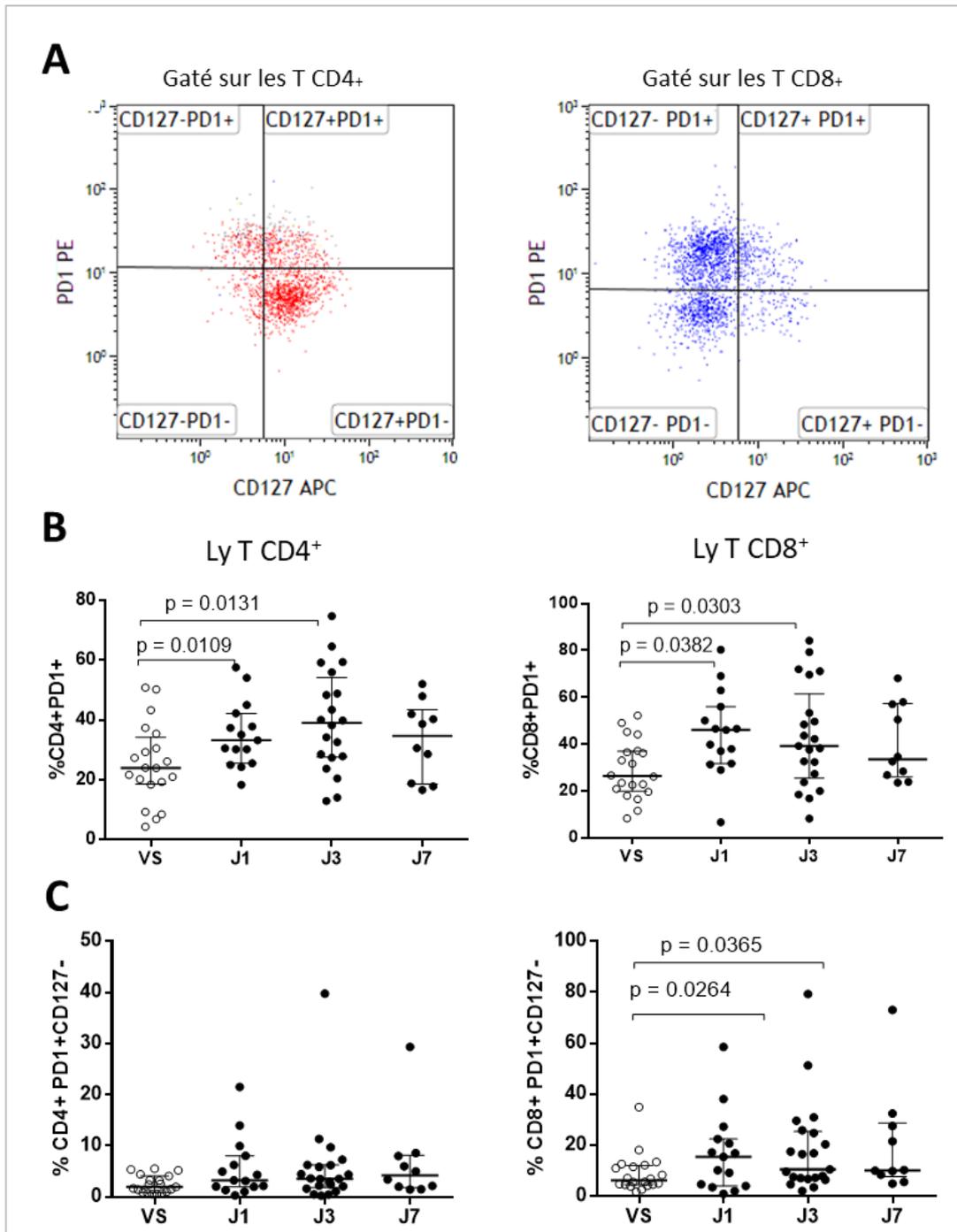
Nous n'observons pas de régulation des transcrits IL7R totaux, ni du transcrit transmembranaire chez les patients en CS. En revanche, les deux transcrits correspondant à la protéine soluble sont significativement réprimés à partir de J3 pour le transcrit IL7R-3 et à tous les temps pour le variant IL7R-7. Par ailleurs, le niveau d'expression des transcrits IL7R-3 et IL7R-7 à J1 est négativement corrélé au score d'atteinte d'organe SOFA ( $r=-0,7859$ ,  $p=0,0014$  et  $r=-0,7845$ ,  $p=0,0015$  respectivement).

### **3.3. Altérations phénotypiques et fonctionnelles lymphocytaires T en lien avec l'IL-7R $\alpha$**

#### **3.3.1. Surexpression des populations PD-1<sup>+</sup> et CD127<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup>**

Dans la seconde partie du travail, afin de caractériser l'état d'épuisement des lymphocytes T, nous avons dans un premier temps mesuré par cytométrie en flux l'expression de surface du récepteur inhibiteur PD-1. De plus, la co-expression de niveaux élevés de PD-1 combiné à une expression faible du CD127 a été montré comme étant présente sur les cellules T non fonctionnelles (110). Nous avons donc voulu évaluer la proportion de cellules CD127<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup> parmi les T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> dans la cohorte de patients septiques. Un exemple de sélection de cette population est représenté sur la figure 25.A.

Les résultats présentés sur la figure 25 confirment la plus forte proportion de cellules PD-1<sup>+</sup>, déjà décrite dans la littérature (73) chez les patients septiques à la fois sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> à J1 et J3. En sélectionnant la population CD127<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup>, on observe une augmentation de ce pourcentage sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> significative à J1 et J3 mais non significative sur les T CD4<sup>+</sup>.



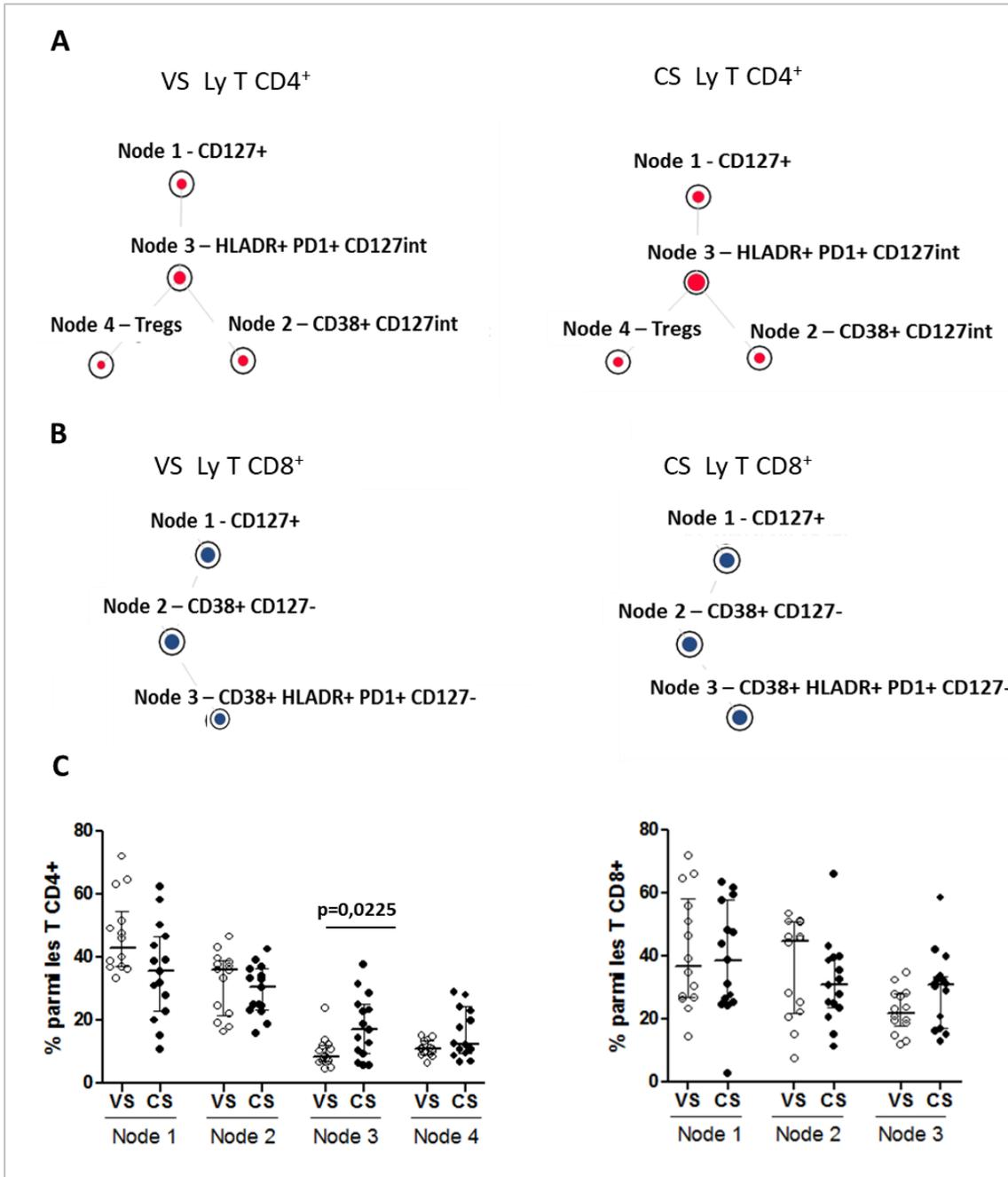
**Figure 25 : Expression de PD-1 et expression combinée de CD127 et PD-1**

(A) Exemples représentatifs de la co-expression de CD127 et PD-1 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (gauche) et T CD8<sup>+</sup> (droite) sur un patient en choc septique. Les populations cellulaires ont été sélectionnées selon le contrôle isotypique pour PD-1 et selon la population positive prise en compte au paragraphe 3.2.1.1. pour le CD127. (B) Comparaison de la proportion de cellules exprimant PD-1 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (gauche) et T CD8<sup>+</sup> (droite) entre VS (n=20) et les patients en choc septique à J1 (n=15), J3 (n=21) et J7 (n=10). (C) Comparaison de la proportion de cellules avec un phénotype CD127-/PD1<sup>+</sup> sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (gauche) et T CD8<sup>+</sup> (droite) entre VS (n=20) et les patients en choc septique à J1 (n=15), J3 (n=21) et J7 (n=10).

### **3.3.2. Caractérisation de la population CD127-/PD-1<sup>+</sup> au sein des stades d'activation T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>**

Dans le but de mieux caractériser la place du récepteur membranaire à l'IL-7 en combinaison avec PD-1 au sein des différents états d'activation et d'épuisement lymphocytaires, nous avons réalisé une étude multiparamétrique non supervisée grâce à l'algorithme SPADE sur la plateforme en ligne Cytobank (cyobank.org). L'outil établit un regroupement des cellules sous forme de clusters ou nœuds, de façon automatique en fonction de la similitude d'expression d'une combinaison de marqueurs d'intérêt prédéfinis. Dans notre étude, plusieurs marqueurs de surface et intracellulaires ont été pris en compte : CD4, CD8, FoxP3, CD127, PD-1, TIM-3, HLA-DR, CD38 et CD25. Ces analyses complémentaires ont été réalisées uniquement sur 15 patients en CS à J3 et sur 14 VS comparables en âge.

En considérant le nombre de marqueurs sélectionnés, nous avons choisi de faire apparaître, sur la représentation SPADE, 4 nœuds cellulaires sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, et 3 pour les CD8<sup>+</sup>. Des exemples de figures SPADE issues de VS et de patients sont représentées sur la figure 26 A. et B. La taille de chaque nœud est proportionnelle au nombre de cellules au sein du cluster (Figure 26 A et B).



**Figure 26 : Analyse sous format SPADE de la répartition des marqueurs d'activation et d'épuisement sur les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> et TCD8<sup>+</sup>**

(A) Exemple représentatif de SPADE pour les T CD4<sup>+</sup> sur un patient à gauche et sur un VS à droite. Les nœuds ont été regroupés par le logiciel selon l'expression de CD127, PD-1, CD38, HLA-DR, CD25 et FoxP3. (B) Exemple représentatif de Spade pour les T CD8<sup>+</sup> sur un VS à gauche et sur un patient à droite. Les nœuds ont été regroupés par le logiciel selon l'expression de CD127, PD-1, CD38 et HLA-DR. (C) Comparaison de la proportion de chaque nœud entre les VS (n=14) et les patients (n=15) sur les CD4<sup>+</sup> (gauche) et sur les CD8<sup>+</sup> (droite) entre VS (n=14) et les patients en choc septique à J3 (n=15).

Selon la figure 26.A, sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, le nœud n°1 exprime fortement le CD127. Le nœud n°2 exprime fortement marqueur d'activation précoce, CD38 (111) et le CD127 de façon intermédiaire. Le nœud n°3 correspond à des cellules exprimant HLA-DR, qui est un marqueur d'activation plus tardif (112). Finalement, le nœud n°4 exprime fortement FoxP3, CD25 et faiblement le CD127 ce qui correspond probablement à un groupe de cellules T régulatrices, FoxP3 étant un marqueur spécifique des T<sub>regs</sub> (113). De façon similaire, sur les T CD8<sup>+</sup>, (Figure 26.B), l'outil a regroupé les cellules exprimant fortement le CD127 sur le nœud n°1, puis les cellules exprimant le CD38 sur le nœud n°2 et enfin sur un 3<sup>ème</sup> nœud, les cellules exprimant fortement HLA-DR. L'expression des niveaux d'expression de chaque marqueur par nœud est représentée en annexe 4.

A la fois sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, les cellules du nœud n°3 expriment fortement PD-1 et ont une expression intermédiaire ou faible du CD127 (Figure 26.A et 26.B). L'analyse non supervisée nous permet donc d'individualiser la sous-population CD127<sup>low</sup>/PD-1<sup>hi</sup> que nous avons décrite dans le paragraphe 3.3.1. par analyse de cytométrie classique. Celle-ci co-exprime également le marqueur d'activation tardif HLA-DR mais pas le CD38 ni FoxP3. Les cellules T CD127<sup>int</sup>/PD-1<sup>hi</sup> ou CD127<sup>low</sup>/PD-1<sup>hi</sup> pourraient ainsi correspondre donc à des cellules activées de façon chronique.

Les cellules du nœud n°3 correspondent à environ 10% du total des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et 20% des T CD8<sup>+</sup> chez les VS (Figure 26.C). En comparant la proportion de chaque nœud entre les VS et patients en CS, le nœud n°3 est significativement plus représenté chez les patients sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Pour les cellules T CD8<sup>+</sup>, nous ne notons pas de différence significative mais il y a tout de même une tendance à l'augmentation du nœud n°3 chez les patients parmi les T CD8<sup>+</sup> totaux.

### **3.3.3. Etude fonctionnelle des lymphocytes T**

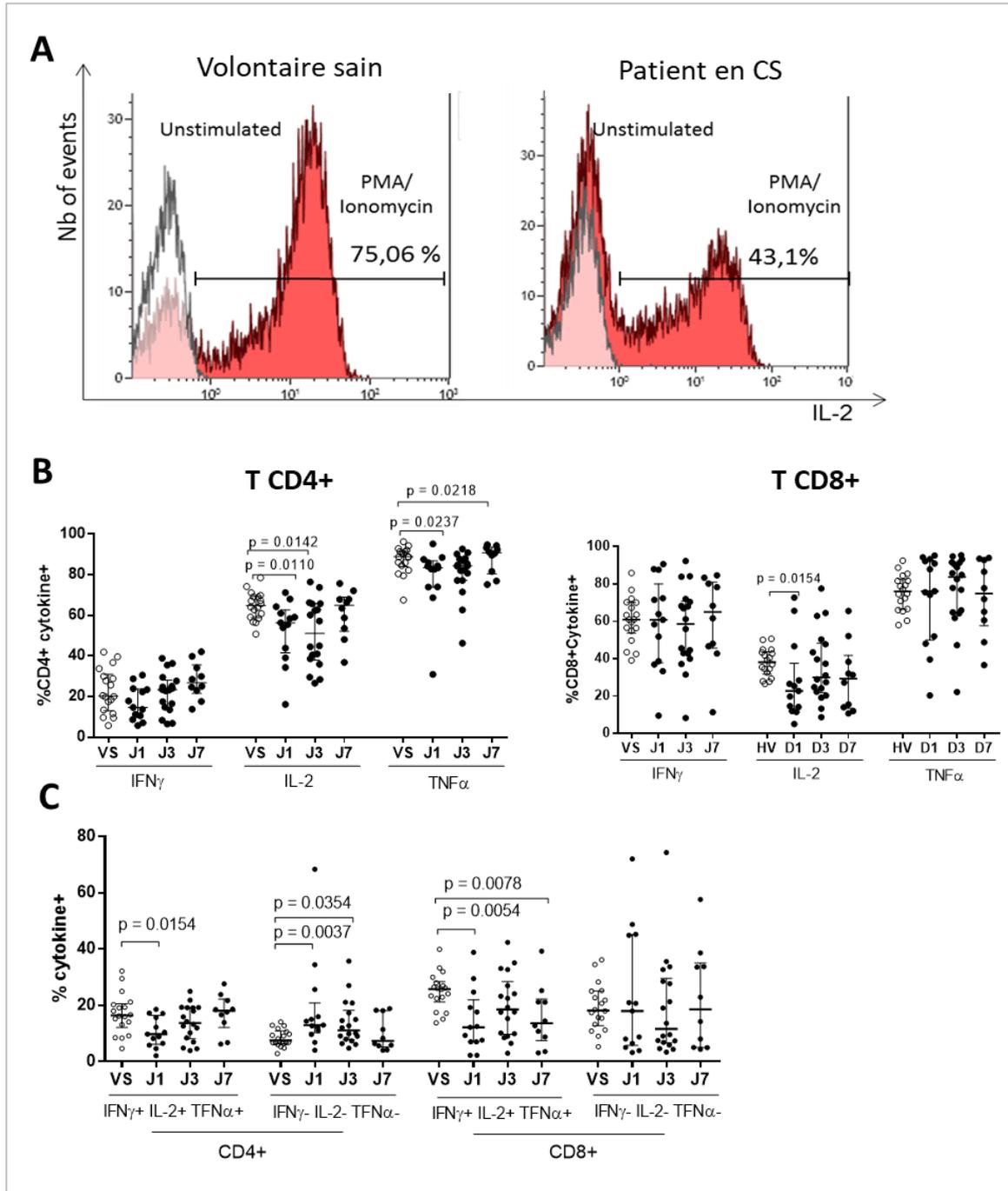
#### **3.3.3.1. Défaut partiel de la production de cytokines intracellulaires**

Pour compléter les résultats obtenus par l'analyse des marqueurs d'activation, nous avons mesuré les capacités de production de cytokines intracellulaires après une activation lymphocytaire par des stimulants non spécifiques du TCR : PMA et Ionomycine. Un exemple

représentatif de la production d'IL-2 sur les T CD4<sup>+</sup> chez un patient par rapport à un témoin est présenté sur la figure 25.A.

La production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est significativement diminuée à J1 et J3 du choc septique et la production de TNF $\alpha$  est aussi plus faible à J1 et J7. Sur les cellules T CD8<sup>+</sup>, les altérations sont plus discrètes. En effet, on note uniquement une perte de la production d'IL-2 à J1 après le CS.

L'étude des lymphocytes polyfonctionnels (*i.e.* produisant les trois cytokines à la fois) permet d'approfondir l'interprétation des résultats. En effet, sur les T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, on note une diminution des cellules produisant les 3 cytokines, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>. On a en parallèle une augmentation des T CD4<sup>+</sup> ne produisant aucune cytokine, (IFN $\gamma$ <sup>-</sup> IL-2<sup>-</sup> TNF $\alpha$ <sup>-</sup>) représentant jusqu'à 15% des T CD4<sup>+</sup>. Cela renforce l'idée que la sous-population T CD4<sup>+</sup> est plus dysfonctionnelle que les T CD8<sup>+</sup>. De plus, le pourcentage de cellules T CD4<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup> est corrélé négativement avec le score SOFA à J1 (n= 11 patients à J1, r=-0.6528 p=0.0156).



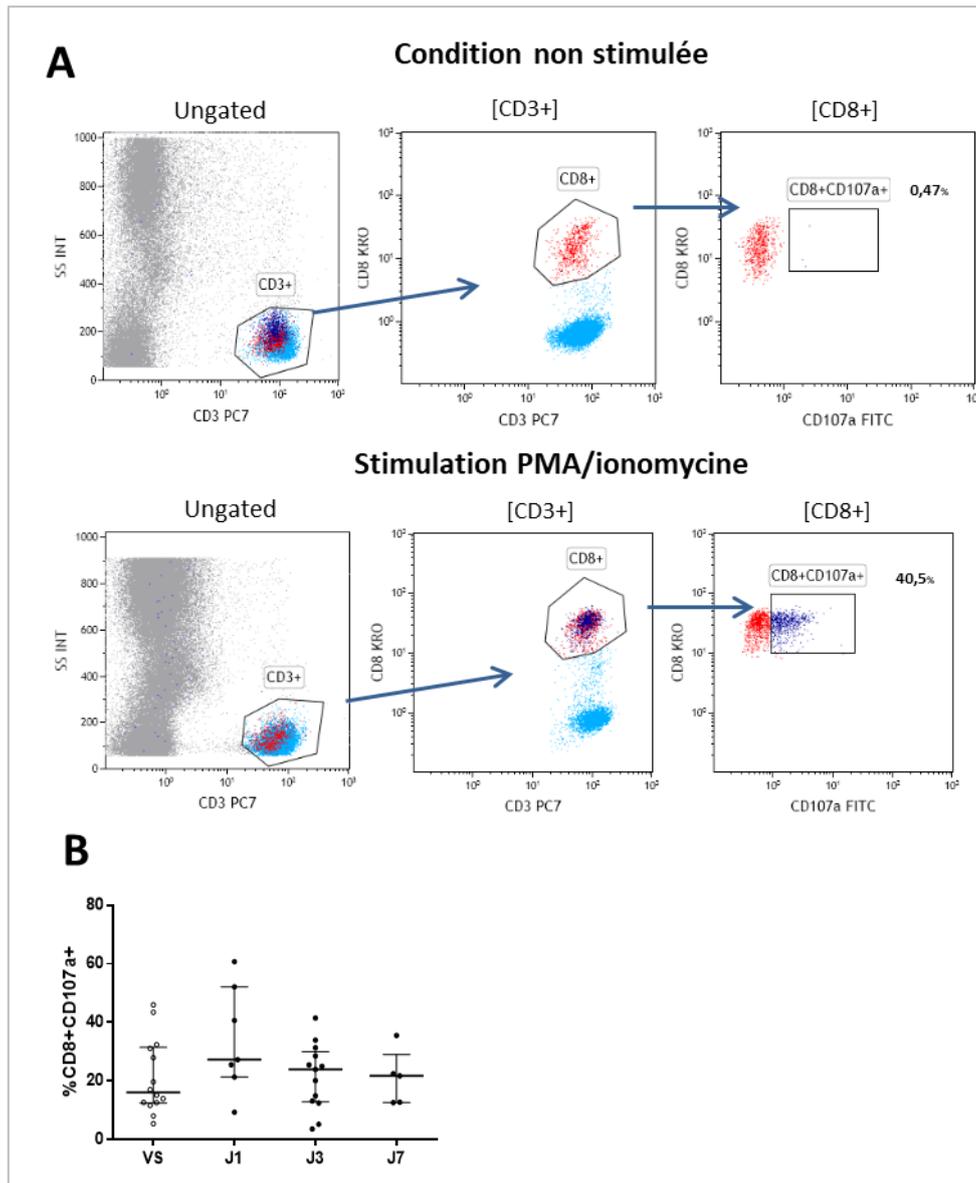
**Figure 25 : Production intracellulaire d'IFN $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF $\alpha$  par les lymphocytes T CD4 $^+$  et T CD8 $^+$**

(A) Exemple représentatif de la sélection des cellules TCD4 $^+$  positives pour la production d'IL-2 chez un VS (gauche) et chez un patient en CS (droite). L'histogramme non rempli correspond à la condition non stimulée et l'histogramme plein à la condition stimulée. (B) Comparaison des proportions de lymphocytes T CD4 $^+$  (gauche) et TCD8 $^+$  (droite) produisant une des trois cytokines entre les VS (n=18) et les patients en CS à J1 (n=14), J3 (n=18) et J7 (n=10). (C) Comparaison des proportions de lymphocytes T CD4 $^+$  (gauche) et T CD8 $^+$  (droite) entre les VS (n=18) et les patients en CS à J1 (n=14), J3 (n=18) et J7 (n=10) produisant à la fois les 3 cytokines (phénotype IFN $\gamma$  $^+$ , IL-2 $^+$  et TNF $\alpha$  $^+$ ) ou ne produisant aucune cytokine (phénotype IFN $\gamma$  $^-$ , IL-2 $^-$  et TNF $\alpha$  $^-$ ).

### 3.3.3.2. Capacités de dégranulation des CD8<sup>+</sup>

Un autre paramètre de la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> a également été évalué. Il s'agit de la capacité de libération du contenu de leurs granules cytotoxiques via la mesure de l'expression membranaire du CD107a. En effet, ce marqueur est physiologiquement présent dans les granules cytotoxiques des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, des cellules NK et également dans les granules plaquettaires. Après stimulation, il est exposé en surface suite à la dégranulation cellulaire. Sa mesure est donc un reflet indirect des cellules ayant libéré le contenu de leurs granules cytotoxiques.

Un exemple de la sélection de la population CD107a positive est présentée sur la figure 26.A. Selon la figure 26.B, les fonctions cytotoxiques des CD8<sup>+</sup> sont maintenues de J1 à J7 après le choc septique.



**Figure 26 : Mesure des capacités de dégranulation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

(A) Exemple représentatif de la sélection des cellules positives pour le marqueur de dégranulation CD107a sur les T CD8<sup>+</sup>. La région de positivité a été placée à 0,5% de la population CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> dans la condition non stimulée (haut). Production d'IL-2 chez un VS (gauche) et chez un patient en CS (droite). (B) Comparaison des proportions de lymphocytes ayant dégranulé après stimulation non spécifique par PMA et Ionomycine pendant 3h (%CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>) entre les VS (n=14) et les patients en CS à J1 (n=7), J3 (n=13) et J7 (n=5).

## Discussion

Le choc septique induit des altérations quantitatives et qualitatives profondes des versants inné et adaptatif de la réponse immunitaire. Une meilleure description de l'immunoparalysie induite dans ce contexte et l'identification de biomarqueurs sensibles et spécifiques de l'immunodépression sont des prérequis fondamentaux pour envisager l'efficacité de traitements immunostimulants, tels que l'Interleukine 7.

Les objectifs de nos travaux cliniques observationnels étaient d'une part de compléter l'étude de la régulation du récepteur à l'IL-7, cible thérapeutique spécifique dans le choc septique, et d'autre part, d'évaluer la place de ce récepteur parmi d'autres marqueurs phénotypiques et fonctionnels d'activation et d'épuisement cellulaires T. En particulier, l'expression de l'IL7R a été suivie sous différentes formes : protéique transmembranaire et soluble, et transcrites sur une cohorte d'une vingtaine de patients jusqu'à 8 jours après le diagnostic du choc en comparaison à des sujets témoins.

### **Expression différentielle du récepteur membranaire et soluble**

L'expression membranaire de l'IL-7R $\alpha$  est en majorité conservée en surface des lymphocytes T après un choc septique. Ceci est concordant avec des travaux précédemment publiés montrant un maintien de son expression sur les lymphocytes T de patients (15,16), suggérant que l'axe IL-7/IL-7R reste toujours stimuable dans le CS. Nous retrouvons un pourcentage de cellules CD127<sup>+</sup> abaissé uniquement sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à J3 post-agression, en accord avec les données de la littérature montrant une diminution de l'expression du récepteur sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> circulants et dans les organes de patients décédés d'une cause septique (15,114). Par ailleurs, l'analyse des sous-populations T naïves et mémoires permet d'apporter un élément nouveau à la compréhension de cette expression différentielle. En effet, nous mettons en évidence, pour la première fois à notre connaissance, l'augmentation d'une sous-population T CD8<sup>+</sup> ayant une expression physiologique très faible de l'IL-7R $\alpha$  : les CD8<sup>+</sup><sub>TD</sub>. La perte apparente sur les T CD8<sup>+</sup> dans leur globalité semble par conséquent être liée à une réorganisation des sous-populations naïves et mémoires avec une augmentation de la sous-population exprimant faiblement le CD127.

Comme nous l'avons précédemment énoncé, cette population CD127 faible a été bien caractérisée dans le cadre d'une expansion clonale physiologique des TCD8<sup>+</sup> (et de façon

moindre pour les T CD4<sup>+</sup>) suite à une reconnaissance antigénique (87,92,93) mais elle est aussi sur-exprimée dans des contextes pathologiques de persistance antigénique chronique à la fois dans des modèle animaux et chez l'homme (infection chronique au VIH, au VHC et cancers) (98–101).

Nous décrivons une diminution de son expression à la surface cellulaire sur une population minoritaire de T CD4<sup>+</sup> : les effecteurs mémoires, ce qui n'affecte pas le niveau d'expression global sur les T CD4<sup>+</sup>. A ce stade, nous ne pouvons pas conclure sur les mécanismes de la diminution du récepteur sur les T CD4<sup>+</sup> EM. Cela pourrait être, entres autres, le résultat physiologique d'une activation cellulaire T post-infection systémique et/ou être de reflet de la réponse inappropriée de l'hôte et notamment du processus d'épuisement cellulaire T induit par le sepsis. Ces hypothèses ont été plus particulièrement étudiées dans la deuxième partie du projet.

Concernant le récepteur soluble, nos résultats ne reproduisent pas la baisse décrite dans la littérature (15,106,115). Plusieurs éléments peuvent expliquer cette discordance, le principal étant le petit effectif de notre cohorte. De plus, l'anticoagulant était différent de celui utilisé dans les études (EDTA versus héparine), et le délai entre le prélèvement et la congélation du plasma était plus long de quelques heures pour les VS que pour les patients. En analysant les données cliniques, nous ne retrouvons pas de corrélation entre la concentration de la forme soluble et les scores SOFA et IGS II. En revanche, on note une tendance à l'augmentation du sCD127 à J1 et J3 chez les patients non survivant à J28 (donnée non montrée). Ceci est concordant avec des données précédemment publiées par l'équipe montrant le potentiel rôle de biomarqueur prédictif d'une issue péjorative de la forme soluble du récepteur (106,115).

A l'inverse, les résultats du dosage de la protéine sécrétée dans le milieu de culture à partir de lymphocytes T purifiés montrent une augmentation significative chez les patients. On peut alors se demander si le niveau de la forme plasmatique mesuré ne serait pas le reflet du compte lymphocytaire. En effet, la forme soluble étant majoritairement produite par les lymphocytes T, la forte lymphopénie présente chez les patients pourrait alors masquer une libération plus importante du récepteur dans la circulation suite à l'activation lymphocytaire T post sepsis.

Au niveau transcriptionnel, seuls les ARNm correspondant à la forme soluble (IL7R-3 et IL7R-7) sont diminués. Leurs niveaux d'expression sont par ailleurs corrélés à la gravité de

l'atteinte multi-viscérale objectivée par le score SOFA signifiant qu'ils pourraient avoir un potentiel rôle en tant que biomarqueur de gravité. En revanche, nous ne montrons pas d'association avec le score IGS II ni avec la mortalité. La mesure des ARNm a également été réalisée à partir de sang total (Annexe 5), et les résultats issus de ces analyses n'ont pas donné les mêmes tendances qu'à partir des échantillons de lymphocytes T purifiés. En effet, ce type de mesure est fortement impacté par la lymphopénie présente chez les patients septiques puisque l'ARN total est extrait à partir de toutes les cellules nucléées du sang périphérique. Ceci est une hypothèse pour expliquer la diminution d'expression de tous les transcrits IL7R mesurés dans ces conditions.

Enfin, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre l'expression de la forme soluble protéique et des ARNm codant pour cette forme ce qui peut signifier qu'il existe une autre source de production de la protéine soluble, comme un clivage de la forme transmembranaire.

### **Phénotype activé et épuisement lymphocytaire partiel au cours du choc septique**

Dans la suite de l'étude, nous avons pour objectif de décrire les sous-populations T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> exprimant différenciellement le récepteur à l'IL-7 au sein de plusieurs états d'activation et/ou d'épuisement et de relier le profil phénotypique aux altérations fonctionnelles T induites par le choc septique.

Nous avons premièrement mesuré le récepteur inhibiteur membranaire PD-1, qui est à la fois un marqueur de dysfonction cellulaire et une cible thérapeutique privilégiée en oncologie (116) et avons confirmé sa surexpression sur les lymphocytes T des patients en CS. Il a aussi été mis en évidence une population CD127<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup>, individualisée sur les T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> et plus fortement exprimée sur les T CD8<sup>+</sup> des patients septiques. Puis, nous avons effectué une analyse non supervisée plus globale incluant un panel de marqueurs d'activation précoces, tardifs, et des éléments caractéristiques d'une régulation négative. Le sous-groupe CD127<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup> a été retrouvé et identifié comme appartenant aux cellules ayant un phénotype d'activation tardive (HLA-DR<sup>+</sup>). Cette sous-population était présente à la fois sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> et sur-exprimée sur les T CD4<sup>+</sup> de patients en CS.

La perte membranaire du CD127 et l'augmentation de PD-1 a été décrite sur des cellules T en situation de stimulation antigénique chronique dans des modèles animaux et chez l'homme et a été rattachée à un profil de cellules T dites « épuisées » (110). En considérant les

travaux sur l'anergie lymphocytaire T induite après un choc septique (56,117) , nous avons voulu évaluer le lien entre le phénotype activé apparent des cellules T de patients et des mesures fonctionnelles.

La production d'IL-2 est affectée sur les deux sous-populations de lymphocytes T alors que le TNF $\alpha$  est seulement moins produit par les lymphocytes T CD4 $^+$ . La production d'IFN $\gamma$  est maintenue à tous les temps. Les pourcentages de lymphocytes T CD4 $^+$  et T CD8 $^+$  trifonctionnels sont diminués à J1 après le choc et les T CD4 $^+$  ne produisant aucune cytokine sont significativement augmentés. La baisse des lymphocytes T CD4 $^+$  triples positifs est par ailleurs corrélée à l'atteinte d'organe initiale. En tout, les cellules T CD4 $^+$  semblent plus altérées que les T CD8 $^+$  puisque la production de TNF $\alpha$  et l'aptitude cytotoxique de dégranulation est maintenue dans ces derniers. Comme cela a déjà été publié dans des travaux de l'équipe (118), selon la cinétique du développement de l'exhaustion décrite par Wherry et al...(18,70), notre cohorte de patients se trouverait plutôt à un stade précoce avec une perte d'expression de l'IL-2 et du TNF $\alpha$ , des capacités de proliférations cellulaires (évaluées dans d'autres études chez le patient septiques (15) et dans le modèle *ex-vivo* complétant notre étude).

Le phénotype de surface CD127 $^{low}$ /PD-1 $^{hi}$ /HLADR $^+$  que nous avons précédemment décrit est donc coexprimé avec des altérations fonctionnelles T, elles-mêmes reliées à une atteinte d'organe importante. Notre étude permet ainsi d'améliorer la compréhension de la répartition les stades d'activation au sein des lymphocytes T après un choc septique et de faire le lien avec des issues fonctionnelles et une atteinte clinique sévère. L'hypothèse d'une « activation-induced-exhaustion » ou « épuisement induit par l'activation » semble donc intéressante pour modéliser les altérations décrites. Le modèle cellulaire *ex-vivo* établi dans l'équipe et consistant en une phase d'activation continue du TCR ou « priming » suivie par une deuxième activation spécifique du TCR reproduit des altérations semblables à celles précédemment décrites.

La lutte contre le phénomène d'épuisement lymphocytaire T est un enjeu majeur en cancérologie avec de multiples essais cliniques utilisant des ligands antagonistes des récepteurs inhibiteurs de surface, et en particulier des agents anti-PD-1 (75). En considérant la complémentarité de ces deux agents dans des modèles murins de sepsis, il pourrait être intéressant de tester l'ajout d'un anticorps anti-PD-1 sur le modèle « d'épuisement induit par l'activation » en complément d'une immunothérapie par IL-7.

## Limites

Notre étude comporte certaines limites inhérentes à la recherche clinique translationnelle. Premièrement, le faible taux de mortalité (3 patients sur 21 pour la première cohorte et 5 sur 17 patients pour le deuxième groupe) ne nous permet pas de faire d'analyse statistique relative à ce paramètre. Nous notons également un faible taux du développement d'IN : 1 patient sur les 31. Par ailleurs, parmi l'ensemble des patients inclus, 12 ont été sélectionnés selon la nouvelle définition du sepsis établie par la conférence de consensus de 2016 (21). Cela a donc pu induire une hétérogénéité dans la sélection des patients.

Ensuite, concernant les conditions pré-analytiques, le délai de traitement des échantillons entre les VS et patients n'était pas similaire. Les échantillons de VS étant collectés le matin à l'EFS et analysés l'après-midi au laboratoire contrairement à ceux des patients qui ont été techniqués dans les 3h après leur prélèvement. Cela a pu impacter certaines mesures notamment le sCD127 plasmatique la mesure des ARNm sur sang total.

Nous avons mis en évidence une régulation de l'expression du récepteur membranaire sur la sous-population  $T_{EM}$  que nous n'avons pas pu confirmer au niveau transcriptionnel. En effet, nos mesures d'ARNm ont été faites uniquement sur cellules T isolées sans distinction des groupes cellulaires. Ainsi nous ne pouvons pas formellement conclure sur une absence de régulation des ARNm transcrits correspondants au récepteur transmembranaire dans cette sous-population.

Enfin, nous n'avons pas pu identifier formellement les lymphocytes T CD127/PD-1<sup>+</sup> comme étant les cellules altérées en termes de production de cytokines. En effet, les cellules PD-1<sup>+</sup> peuvent correspondre à des cellules tout à fait fonctionnelles. Il a été montré que le phénotype épuisé était présent lors de la co-expression avec d'autres checkpoints inhibiteurs (TIM-3, BTLA, CTLA-4) (119,120) que nous n'avons pas tous mesurés. Parmi ceux-ci, nous avons sélectionné TIM-3, que nous avons choisi de ne pas présenter car il était très faiblement exprimé à la fois sur les cellules des patients et des VS.

# CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mme ALLAM Camille

Le sepsis a été récemment redéfini comme une « dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital, causée par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection ». Malgré de nombreuses avancées diagnostiques et thérapeutiques, les syndromes septiques représentent toujours la première cause d'admission en réanimation et ont un pronostic très péjoratif. En particulier, l'amplitude et la persistance d'un état d'immunosuppression sont associées à la survenue d'infections secondaires ou à des réactivations virales participant à une mortalité élevée. Ainsi, les efforts de recherche thérapeutique de ces dernières années ont porté sur le développement de traitements immunostimulants parmi lesquels l'interleukine-7 (IL-7) apparaît comme une molécule prometteuse pour lutter contre l'épuisement lymphocytaire T induit par le sepsis. Néanmoins, l'étude du récepteur de l'IL-7, indispensable à sa fonction, demeure incomplète chez les patients septiques.

Nos travaux ont constitué en une description exhaustive de la régulation des différentes formes du récepteur à l'IL-7 sur les lymphocytes T de patients en choc septique. A l'exception d'une sous-population (quantitativement peu représentée), nous montrons une absence de régulation significative du récepteur sous forme protéique transmembranaire (IL-7R $\alpha$  ou CD127) et de son transcrite ARNm correspondant. Ceci renforce l'idée selon laquelle la voie de signalisation de l'IL-7 reste toujours stimulable et est en accord avec les résultats d'études précédentes montrant le rétablissement des fonctions lymphocytaires suite à l'administration d'IL-7 dans des modèles animaux ou, *ex vivo*, sur des cellules de patients. A l'inverse, nous mettons en évidence, à partir de cellules T isolées, une diminution de l'expression de deux ARNm correspondant au récepteur soluble et une association négative entre leurs concentrations et le score de défaillance d'organes SOFA.

De plus, nous montrons que le récepteur membranaire à l'IL-7 est différentiellement exprimé selon le statut d'activation lymphocytaire T au cours du choc septique. En particulier, nous mettons en évidence, chez les patients, une augmentation de la proportion d'une sous-

population de lymphocytes T qui présente un niveau faible d'expression du CD127 (CD127<sup>low</sup>) et qui surexprime le récepteur inhibiteur PD-1 (PD-1<sup>hi</sup>). Ces cellules expriment également le marqueur d'activation tardive HLA-DR.

Ce phénotype particulier apparaît de façon concomitante à une altération de la production intracellulaire de cytokines, élément caractéristique de l'épuisement lymphocytaire, touchant majoritairement la population T CD4<sup>+</sup> dans nos travaux. L'élévation de la sous-population CD127/PD1<sup>+</sup> et les altérations fonctionnelles des lymphocytes T pourraient donc être une conséquence de l'état d'activation cellulaire induit par le sepsis. Cette hypothèse d'un « épuisement induit par l'activation » a été confirmée dans un modèle cellulaire *ex-vivo* établi par l'équipe, sur lequel un traitement par de l'IL-7 permet d'améliorer les capacités fonctionnelles des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

En conclusion, nos résultats renforcent l'utilisation de l'IL-7 comme traitement immunostimulant dans la phase d'immunosuppression induite par le choc septique et identifient les ARNm de la forme soluble du récepteur à l'IL-7 comme biomarqueurs potentiels de cette immunosuppression. Ils suggèrent également que la régulation du récepteur à l'IL-7 et les altérations des lymphocytes T observées au cours du choc septique seraient le reflet d'un « épuisement induit par l'activation ».

**Le Président de la Thèse,**

Nom : HONNERET

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 23/11/2017

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie



Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

## Références Bibliographiques

1. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Facing the challenge: Decreasing case fatality rates in severe sepsis despite increasing hospitalizations\*: Crit Care Med. nov 2005;33(11):2555- 62.
2. Quenot JP, Pavon A, Fournel I, Barbar SD, Bruyère R. Le choc septique de l'adulte en France : vingt ans de données épidémiologiques. Réanimation. mai 2015;24(3):303- 9.
3. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. Virulence. janv 2014;5(1):4- 11.
4. Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. JAMA. 3 oct 2017;318(13):1241.
5. Vincent J-L, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. The Lancet. mars 2013;381(9868):774- 5.
6. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. Nat Rev Immunol. 15 nov 2013;13(12):862- 74.
7. Delano MJ, Ward PA. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. Immunol Rev. nov 2016;274(1):330- 53.
8. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. Nat Med. mai 2009;15(5):496- 7.
9. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4+ T Lymphocytes in Humans. J Immunol. 1 juin 2001;166(11):6952- 63.
10. Monneret G, Debard A-L, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, et al. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis: Crit Care Med. juill 2003;31(7):2068- 71.
11. Venet F, Pachot A, Debard A-L, Bohé J, Bienvenu J, Lepape A, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes: Crit Care Med. nov 2004;32(11):2329- 31.
12. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. N Engl J Med. 9 janv 2003;348(2):138- 50.
13. Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? Trends Mol Med. avr 2014;20(4):195- 203.
14. Unsinger J, Burnham C-AD, McDonough J, Morre M, Prakash PS, Caldwell CC, et al. Interleukin-7 Ameliorates Immune Dysfunction and Improves Survival in a 2-Hit Model of Fungal Sepsis. J Infect Dis. 15 août 2012;206(4):606- 16.

15. Venet F, Foray A-P, Villars-Mechin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, et al. IL-7 Restores Lymphocyte Functions in Septic Patients. *J Immunol.* 15 nov 2012;189(10):5073- 81.
16. Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, et al. IL-7 Promotes T Cell Viability, Trafficking, and Functionality and Improves Survival in Sepsis. *J Immunol.* 1 avr 2010;184(7):3768- 79.
17. Goodwin R. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: Demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell.* 23 mars 1990;60(6):941- 51.
18. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* juin 2011;131(6):492- 9.
19. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest.* juin 1992;101(6):1644- 55.
20. Levy MM, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* avr 2003;29(4):530- 8.
21. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 23 févr 2016;315(8):801.
22. Machado FR, Nsutebu E, Abdulaziz S, Daniels R, Finfer S, Kissoon N, et al. Sepsis 3 from the perspective of clinicians and quality improvement initiatives. *J Crit Care.* août 2017;40:315- 7.
23. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 17 avr 2003;348(16):1546- 54.
24. Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, et al. Nationwide Trends of Severe Sepsis in the 21st Century (2000–2007). *Chest.* nov 2011;140(5):1223- 31.
25. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* févr 2016;193(3):259- 72.
26. Lagu T, Rothberg MB, Shieh M-S, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007: *Crit Care Med.* mars 2012;40(3):754- 61.
27. Coopersmith CM, Wunsch H, Fink MP, Linde-Zwirble WT, Olsen KM, Sommers MS, et al. A comparison of critical care research funding and the financial burden of critical illness in the United States\*: *Crit Care Med.* avr 2012;40(4):1072- 9.
28. Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest.* 4 janv 2016;126(1):23- 31.

29. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. *JAMA*. 27 oct 2010;304(16):1787.
30. Leligdowicz A, Dodek PM, Norena M, Wong H, Kumar A, Kumar A. Association between Source of Infection and Hospital Mortality in Patients Who Have Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 mai 2014;189(10):1204- 13.
31. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. févr 2006;34(2):344- 53.
32. Vincent J-L. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*. 2 déc 2009;302(21):2323.
33. Kempker JA, Martin GS. The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. *Clin Chest Med*. juin 2016;37(2):165- 79.
34. Howell MD, Davis AM. Management of Sepsis and Septic Shock. *JAMA*. 28 févr 2017;317(8):847.
35. Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL, Fisher MA, Barker E, Garrone NF, et al. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diagn Microbiol Infect Dis*. déc 2012;74(4):349- 55.
36. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock. *Crit Care Med*. mars 2017;45(3):486- 552.
37. Head LW, Coopersmith CM. Evolution of Sepsis Management. *Adv Surg*. sept 2016;50(1):221- 34.
38. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. mars 2013;13(3):260- 8.
39. Murphy Kenneth, Casey Weaver. Innate Immunity: The First Lines of Defense. In: *Janneway's Immunobiology*. 9th éd. Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC; 2017.
40. Kevin Young SG. Essentials of Human Physiology- Localized Inflammatory Response. In 2013.
41. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *The Lancet*. janv 2005;365(9453):63- 78.
42. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. oct 2008;8(10):776- 87.
43. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet*. juill 2002;360(9328):219- 23.
44. Fourrier F. Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: Dead end or one way? *Crit Care Med*. sept 2012;40(9):2704- 8.

45. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis M-A, Plassais J, Jallades L, et al. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol.* 1 déc 2015;98(6):1081- 90.
46. Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis: *Curr Opin Infect Dis.* juin 2012;25(3):321- 7.
47. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol.* 22 avr 2014;14(5):302- 14.
48. Cazalis M-A, Friggeri A, Cavé L, Demaret J, Barbalat V, Cerrato E, et al. Decreased HLA-DR antigen-associated invariant chain (CD74) mRNA expression predicts mortality after septic shock. *Crit Care.* 2013;17(6):R287.
49. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohé J, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* nov 2010;36(11):1859- 66.
50. Poujol F, Monneret G, Pachot A, Textoris J, Venet F. Altered T Lymphocyte Proliferation upon Lipopolysaccharide Challenge Ex Vivo. Zissel G, éditeur. *PLOS ONE.* 7 déc 2015;10(12):e0144375.
51. Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science.* 26 sept 2014;345(6204):1251086- 1251086.
52. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Parlato M, Philippart F, Misset B, Cavaillon J-M, Adib-Conquy M, et al. Toll-like receptors expression and interferon- $\gamma$  production by NK cells in human sepsis. *Crit Care.* 2012;16(5):R206.
53. Grimaldi D, Louis S, Pène F, Sirgo G, Rousseau C, Claessens YE, et al. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* sept 2011;37(9):1438 - 46.
54. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of Dendritic Cells, But Not Macrophages, in Patients with Sepsis. *J Immunol.* 1 mars 2002;168(5):2493- 500.
55. Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, El Gazzar M. Myeloid-Derived Suppressor Cells Evolve during Sepsis and Can Enhance or Attenuate the Systemic Inflammatory Response. Bäumlér AJ, éditeur. *Infect Immun.* juin 2012;80(6):2026- 34.
56. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock Augusta Ga.* déc 2002;18(6):487- 94.
57. Girardot T, Rimmelé T, Venet F, Monneret G. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis.* févr 2017;22(2):295- 305.
58. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent Lymphopenia After Diagnosis of Sepsis Predicts Mortality: *Shock.* nov 2014;42(5):383- 91.

59. Chung K-P, Chang H-T, Lo S-C, Chang L-Y, Lin S-Y, Cheng A, et al. Severe Lymphopenia Is Associated with Elevated Plasma Interleukin-15 Levels and Increased Mortality During Severe Sepsis: Shock. juin 2015;43(6):569- 75.
60. Brahmamdam P, Inoue S, Unsinger J, Chang KC, McDunn JE, Hotchkiss RS. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. J Leukoc Biol. 1 août 2010;88(2):233- 40.
61. Claude-Alexandre Gu, Gossez M, Demaret J, Rimmelé T, Lepape A, Malcus C, et al. Septic shock shapes B cell response toward an exhausted / immunoregulatory profile in patients. en cours de révision.
62. Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. Curr Opin Immunol. août 2013;25(4):477- 83.
63. Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A, Malcus C, Poitevin-Later F, Grives A, et al. Decreased T-Cell Repertoire Diversity in Sepsis: A Preliminary Study. Crit Care Med. janv 2013;41(1):111- 9.
64. Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. Crit Care. 2011;15(2):R99.
65. Shubin NJ, Monaghan SF, Heffernan DS, Chung C-S, Ayala A. B and T lymphocyte attenuator expression on CD4+ T-cells associates with sepsis and subsequent infections in ICU patients. Crit Care. 2013;17(6):R276.
66. Roth G, Moser B, Krenn C, Brunner M, Haisjackl M, Almer G, et al. Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. Biochem Biophys Res Commun. sept 2003;308(4):840- 6.
67. Manjuck J, Saha DC, Astiz M, Eales L-J, Rackow EC. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. J Lab Clin Med. févr 2000;135(2):153- 60.
68. Heidecke C-D, Hensler T, Weighardt H, Zantl N, Wagner H, Siewert J-R, et al. Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. Am J Surg. oct 1999;178(4):288- 92.
69. Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, Kelly R, Rode H, Gordon J, MacLean LD. Delayed Hypersensitivity: Indicator of Acquired Failure of Host Defenses in Sepsis and Trauma. Ann Surg. sept 1977;186(3):241-50.
70. Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. Virology. mai 2015;479- 480:180- 93.
71. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJD, Suresh M, Altman JD, et al. Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. J Exp Med. 21 déc 1998;188(12):2205- 13.

72. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.* 18 juin 2015;6(6):e1792.
73. Patil N, Guo Y, Luan L, Sherwood E. Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis. *Int J Mol Sci.* 14 nov 2017;18(11):2413.
74. Sharma P, Wagner K, Wolchok JD, Allison JP. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat Rev Cancer.* 24 oct 2011;11(11):805- 12.
75. Eika S, Webb, Peng Liu, Renato Baleeiro, Nicholas R. Lemoine, Ming Yuan, Yaohe Wang. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *J Biomed Res.* 4 sept 2017;
76. Venet F, Rimmelé T, Monneret G. Management of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Crit Care Clin.* janv 2018;34(1):97- 106.
77. Chang KC, Burnham C-A, Compton SM, Rasche DP, Mazuski R, SMcDonough J, et al. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit Care.* 2013;17(3):R85.
78. Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard J-P, Goujard C, Lelièvre J-D, et al. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest.* 16 mars 2009;
79. Morre M, Beq S. Interleukin-7 and immune reconstitution in cancer patients: a new paradigm for dramatically increasing overall survival. *Target Oncol.* mars 2012;7(1):55- 68.
80. Shindo Y, Unsinger J, Burnham C-A, Green JM, Hotchkiss RS. Interleukin-7 and Anti-Programmed Cell Death 1 Antibody Have Differing Effects to Reverse Sepsis-Induced Immunosuppression: *Shock.* avr 2015;43(4):334- 43.
81. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell.* oct 1990;63(1):235- 43.
82. Whitlock CA, Tidmarsh GF, Muller-Sieburg C, Weissman IL. Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. *Cell.* mars 1987;48(6):1009- 21.
83. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol.* mai 2011;11(5):330- 42.
84. Vranjkovic A, Crawley AM, Gee K, Kumar A, Angel JB. IL-7 decreases IL-7 receptor (CD127) expression and induces the shedding of CD127 by human CD8+ T cells. *Int Immunol.* 1 déc 2007;19(12):1329- 39.
85. Crawley AM, Faucher S, Angel JB. Soluble IL-7R (sCD127) Inhibits IL-7 Activity and Is Increased in HIV Infection. *J Immunol.* 1 mai 2010;184(9):4679- 87.
86. Lundstrom W, Highfill S, Walsh STR, Beq S, Morse E, Kockum I. Soluble IL7R potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci.* 7 mai 2013;110(19):E1761- 70.

87. Carrette F, Surh CD. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Semin Immunol.* juin 2012;24(3):209- 17.
88. Archive Ensembl Database. Gene: IL7R ENSG00000168685 [En Ligne] 2016. Consultée le 29/10/2017.
89. Kittipatarin C, Khaled AR. Interlinking interleukin-7. *Cytokine.* juill 2007;39(1):75- 83.
90. Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol.* juill 2003;4(7):680- 6.
91. Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol.* juill 2003;4(7):680- 6.
92. Bradley LM, Haynes L, Swain SL. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol.* mars 2005;26(3):172- 6.
93. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *J Virol.* 1 juin 2004;78(11):5535- 45.
94. Nguyen V, Mendelsohn A, Larrick JW. Interleukin-7 and Immunosenescence. *J Immunol Res.* 2017;2017:1- 17.
95. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet.* déc 1998;20(4):394- 7.
96. Lang KS, Recher M, Navarini AA, Harris NL, Löhning M, Junt T, et al. Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol.* mars 2005;35(3):738- 45.
97. Vudattu NK, Magalhaes I, Schmidt M, Seyfert-Margolis V, Maeurer MJ. Reduced numbers of IL-7 receptor (CD127) expressing immune cells and IL-7-signaling defects in peripheral blood from patients with breast cancer. *Int J Cancer.* 1 oct 2007;121(7):1512- 9.
98. Kared H, Saeed S, Klein MB, Shoukry NH. CD127 Expression, Exhaustion Status and Antigen Specific Proliferation Predict Sustained Virologic Response to IFN in HCV/HIV Co-Infected Individuals. *Shin E-C, éditeur. PLoS ONE.* 9 juill 2014;9(7):e101441.
99. Barathan M, Mohamed R, Saeidi A, Vadivelu J, Chang LY, Gopal K, et al. Increased frequency of late-senescent T cells lacking CD127 in chronic hepatitis C disease. *Eur J Clin Invest.* mai 2015;45(5):466- 74.
100. Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Muthukumar A, Dunham R, Gordon S, et al. Loss of CD127 Expression Defines an Expansion of Effector CD8+ T Cells in HIV-Infected Individuals. *J Immunol.* 1 mars 2005;174(5):2900- 9.
101. Shive CL, Clagett B, McCausland MR, Mudd JC, Funderburg NT, Freeman ML, et al. Inflammation Perturbs the IL-7 Axis, Promoting Senescence and Exhaustion that Broadly Characterize Immune Failure in Treated HIV Infection: *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr.* avr 2016;71(5):483- 92.

102. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, et al. Liver-Infiltrating Lymphocytes in Chronic Human Hepatitis C Virus Infection Display an Exhausted Phenotype with High Levels of PD-1 and Low Levels of CD127 Expression. *J Virol*. 15 mars 2007;81(6):2545- 53.
103. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 28 févr 2013;121(9):1612- 21.
104. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. The changing immune system in sepsis: Is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence*. janv 2014;5(1):45- 56.
105. Peronnet E, Mouillaux J, Monneret G, Gallet-Gorius E, Blein-Henry S, Lepape A, et al. Elevated soluble IL-7 receptor concentration in non-survivor ICU patients. *Intensive Care Med*. oct 2016;42(10):1639- 40.
106. Demaret J, Villars-Méchin A, Lepape A, Plassais J, Vallin H, Malcus C, et al. Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med*. août 2014;40(8):1089- 96.
107. Delwarde B, Peronnet E, Cerrato E, Venet F, Lepape A, Rimmelé T, Monneret G, Textoris J. IL7R transcriptional expression analysis during septic shock. Poster présenté à; 2016; *Crit Care* 20:P025.
108. Suni MA, Maino VC, Maecker HT. Ex vivo analysis of T-cell function. *Curr Opin Immunol*. août 2005;17(4):434- 40.
109. Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, et al. CCR7 Expression and Memory T Cell Diversity in Humans. *J Immunol*. 15 janv 2001;166(2):877- 84.
110. McKinney EF, Lee JC, Jayne DRW, Lyons PA, Smith KGC. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature*. 30 juill 2015;523(7562):612- 6.
111. Sandoval-Montes C. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J Leukoc Biol*. 23 déc 2004;77(4):513- 21.
112. Salgado FJ, Lojo J, Fernandez-Alonso CM, Vinuela J, Cordero OJ, Nogueira M. Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells. *Immunol Cell Biol*. avr 2002;80(2):138- 47.
113. Hori S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*. 14 févr 2003;299(5609):1057- 61.
114. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA*. 21 déc 2011;306(23):2594.

115. the MIP Réa Study Group, Peronnet E, Mouillaux J, Monneret G, Gallet-Gorius E, Blein-Henry S, et al. Elevated soluble IL-7 receptor concentration in non-survivor ICU patients. *Intensive Care Med.* oct 2016;42(10):1639- 40.
116. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med.* 27 sept 2010;207(10):2187- 94.
117. Inoue S, Suzuki K, Komori Y, Morishita Y, Suzuki-Utsunomiya K, Hozumi K, et al. Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit Care.* 2014;18(3):R130.
118. Letessier W, Demaret J, Gossez M, Allam C, Venet F, Rimmelé T, et al. Decreased intra-lymphocyte cytokines measurement in septic shock patients: A proof of concept study in whole blood. *Cytokine.* 29 sept 2017;
119. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol.* 2015;6:310.
120. Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Fuertes Marraco SA. Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than « Exhaustion » of Human CD8 T Cells. *Front Immunol.* 2013;4:455.



# ANNEXES



# Annexe 1 : Poster présenté au congrès national de la Société Française d'Immunologie. (Novembre 2017)



## T cell activation participates in IL-7 receptor regulation and T lymphocyte exhaustion in septic shock patients

Mouillaux J, Allam C, Gossez M, Tabone O, Cerrato E, Rimmele T, Textoris J, Monneret G, Peronnet E, Venet F

EA 7426 « Pathophysiology of injury induced immunosuppression (PI3) » Lyon 1 University / Hospices Civils de Lyon / bioMérieux, LYON France

Corresponding author: julie.mouillaux@biomerieux.com



**Context** Septic syndrome is the leading cause of mortality for critically ill patients worldwide. Patients develop lymphocyte dysfunctions associated with increased risk of death and nosocomial infections. Specifically, T cell alterations are the hallmark of an exhausted status. IL-7 is currently tested in clinical trials to reverse T cell dysfunctions. IL-7 receptor (IL-7R) exists in different forms: membrane protein (CD127), soluble protein (sCD127) and different mRNA transcripts. The phenotype CD127<sup>low</sup>PD1<sup>high</sup> has been proposed as an exhaustion marker for T cells. The aim of this study was to evaluate IL-7R expression in septic shock patients and in an ex vivo model, and to study the association between the phenotype CD127-PD1+ and the activated/exhausted status of septic shock patients T cells.

### Material and methods

**Patients** 32 septic shock patients and 34 age-matched healthy volunteers (HV) were included. Patients samples were collected at Day 1 (D1, n=15), Day 3 (D3, n=30) and Day 7 (D7, n=10) after septic shock onset.

**Ex vivo model of IL-7R expression (model 1)** Purified T cells from 10 HV were stimulated during 24 or 48h in presence of IL-7, Dexamethasone (Dex) or anti CD3/28 antibodies coated beads (αCD3/28 beads).

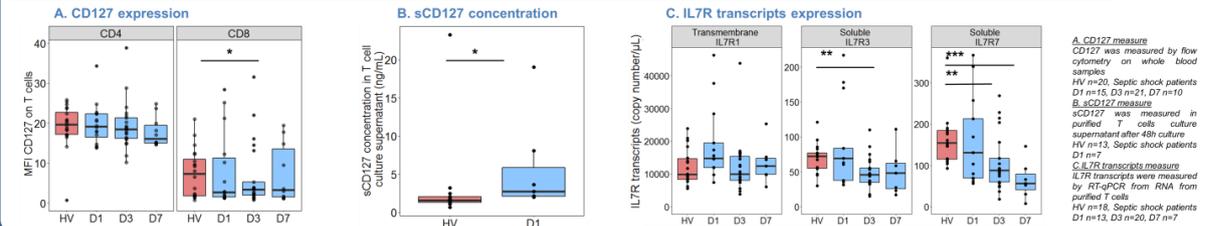
**Ex vivo model of activation induced exhaustion (model 2)** This model consisted of two phases: a priming phase following by an activation phase. Purified T cells from 5 HV were cultured during 5 days with αCD3/28 beads. Culture with αCD3 beads and without any beads were used as controls. After this priming phase, T cells were phenotyped. T cells were then activated during 3 days with αCD2/3/28 beads and proliferation as well as T cell functionality intracellular cytokines staining (IL-2, TNFα and IFNγ) were performed for flow cytometry in T cells from septic patients and from the model 2. T cell proliferation was measured using a Click-iT assay in the model 2.

**IL-7R expression** CD127 was measured by flow cytometry, sCD127 by ELISA and 3 IL7R transcripts by RT-qPCR (IL7R-1 transcript coding for CD127, IL7R-3 coding for sCD127 and IL7R-7 potentially coding for sCD127). sCD127 was measured in purified T cell culture supernatant after 48h culture. IL7R transcripts were measured from RNA from purified T cells. IL-7R expression measures were performed both in T cells from septic patients and from the model 1.

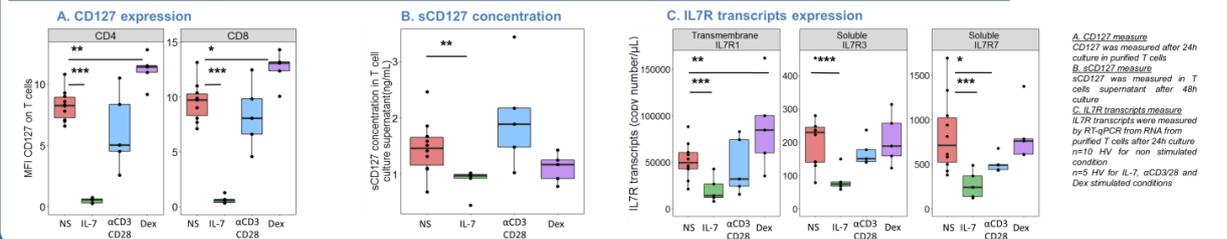
**T cell phenotype** T cells from septic shock patients and from the model 2 were characterized using HLA-DR, CD127 and PD-1 markers.

**Statistics** p-values were calculated using Mann-Whitney test, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001

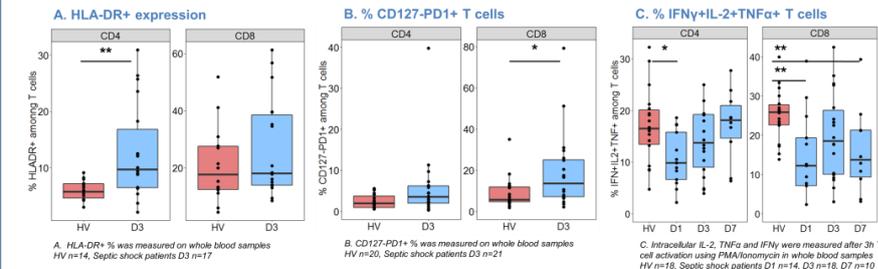
### 1. IL7R soluble transcripts are downregulated and soluble CD127 release is upregulated in septic shock patients T cells



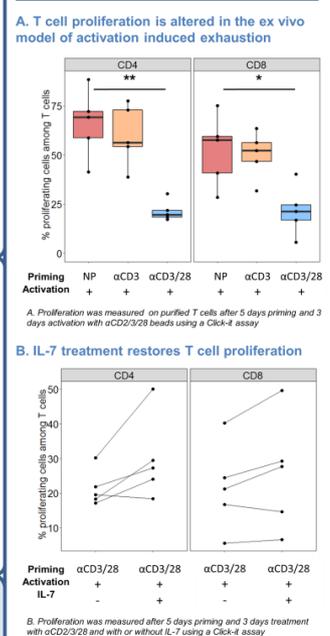
### 2. IL-7R expression regulation observed in septic shock patients is reproduced ex vivo after T cell activation



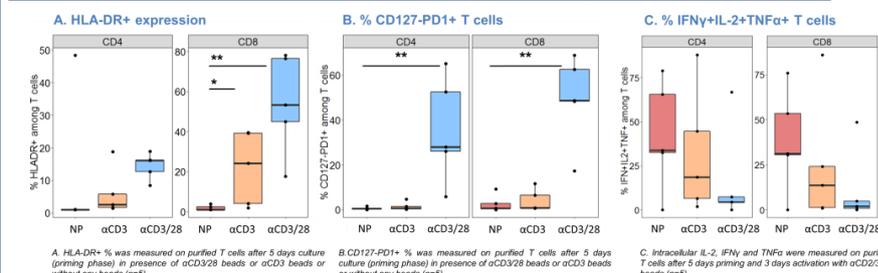
### 3. Patients T cells express the activation marker HLA-DR and increased proportion of CD127-PD1+ T cells simultaneously with altered cytokines production



### 5. IL-7 can restore T cell proliferation in the ex vivo model of activation induced exhaustion

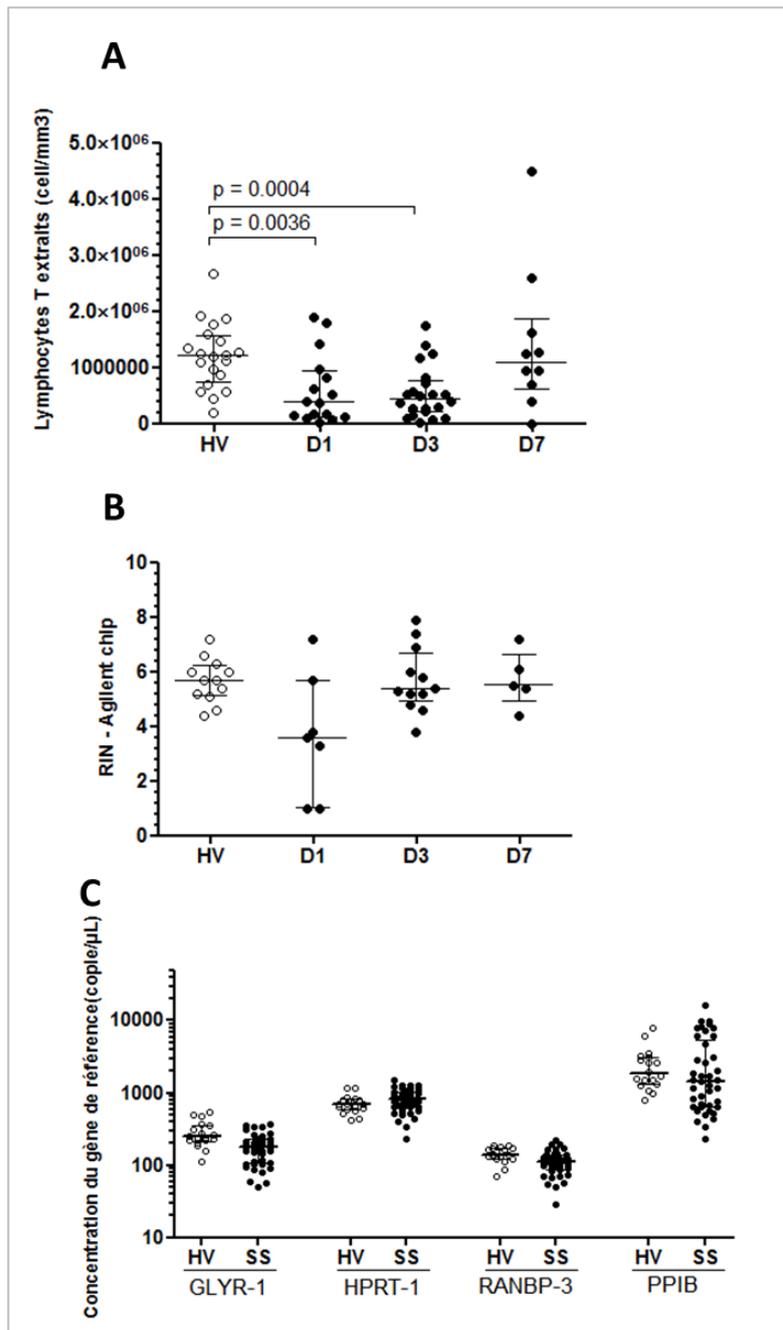


### 4. Ex vivo model of activation induced exhaustion reproduces patients T cells alterations



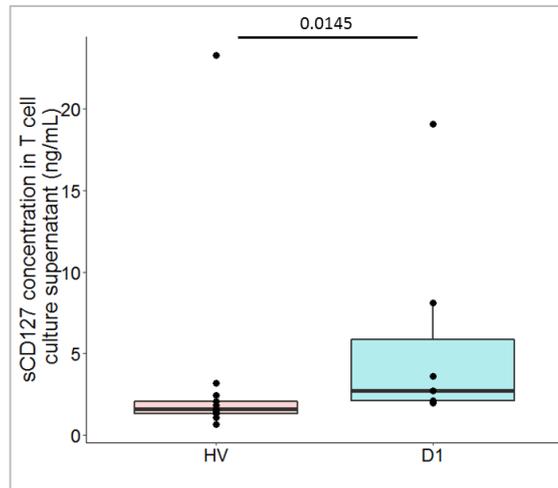
**Conclusion** IL-7R expression regulation observed in septic shock patients is reproduced ex vivo by T cell activation. This suggests that IL-7R regulation in sepsis could be a physiological consequence of T cell activation. Moreover, septic patients T cells expressed higher level of HLA-DR, a late activation marker, than HV. The percentage of CD127-PD1+ T cells is also increased in septic shock patients T cells. These phenotypic alterations occur simultaneously with functional alterations. Both phenotypic and functional alterations are reproduced ex vivo in a model of activation induced exhaustion. IL-7 can partially restore T cell proliferation in this model. T cell activation may thus participate in T cell exhaustion in septic shock. In this context, IL-7 treatment is relevant to restore T cell function during septic shock.

Annexe 2 : Données supplémentaires sur les extractions cellulaires et mesures des ARNm



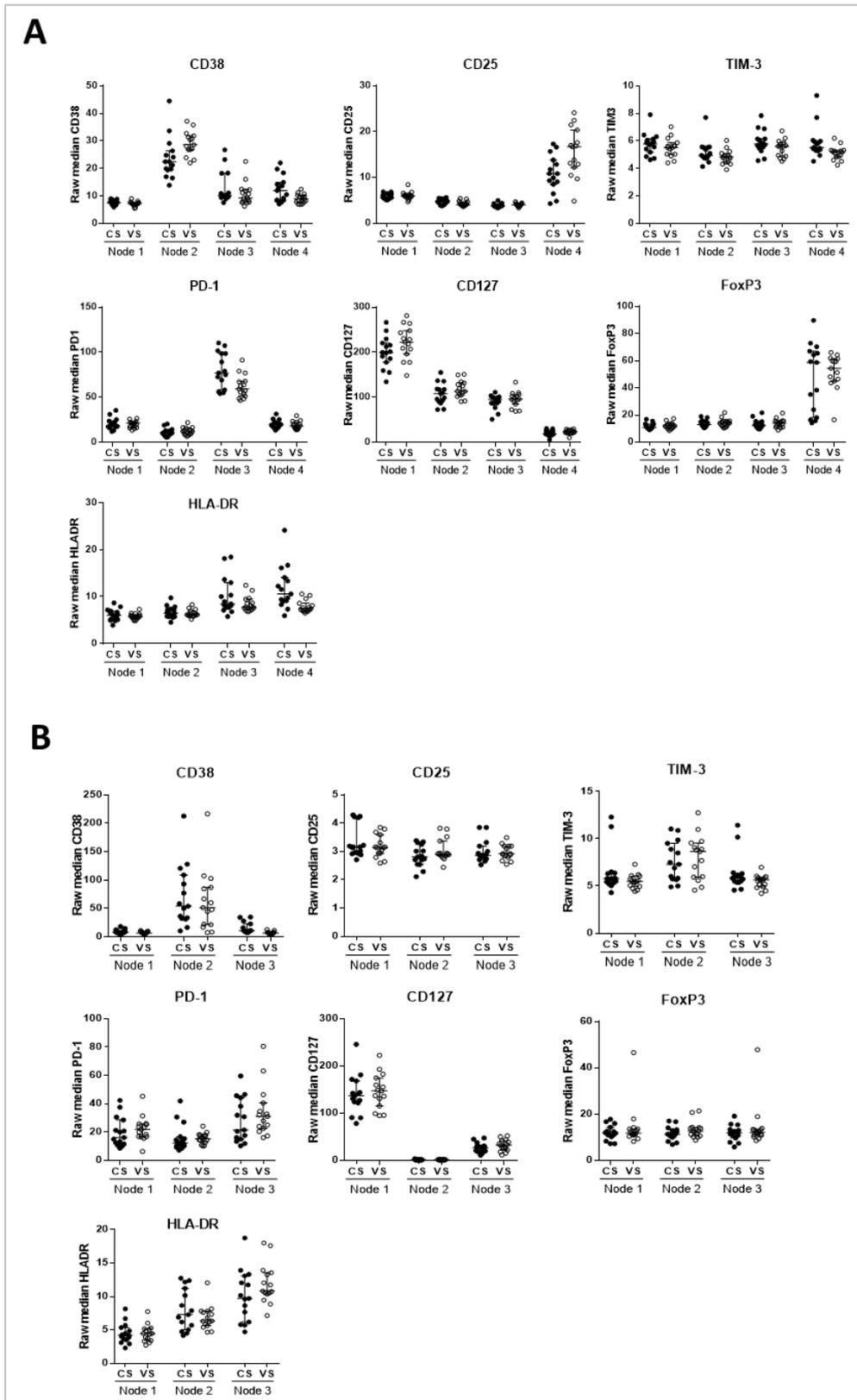
(A) Nombre de cellules T extraites des échantillons de sang total chez les VS (n=20), et les patients à J1 (n = 16), J3 (n=22) et J7 (n=10) (B) Qualité de l'ARN total extrait évalué par le RNA Integrity Number (RIN) sur des puces Agilent. Chez les VS (n=12) et les patients à J1 (n=7), J3 (n=12) et J7 (n=5) (C) Expression des gènes de référence GLYR-1, HPRT-1, RANBP-3 et PPIB en fonction chez les VS (n=18) et les patients (n = 41)

**Annexe 3 : mesure de la production de sCD127 dans le surnageant de lymphocytes T purifiés mis en culture pendant 48H.**



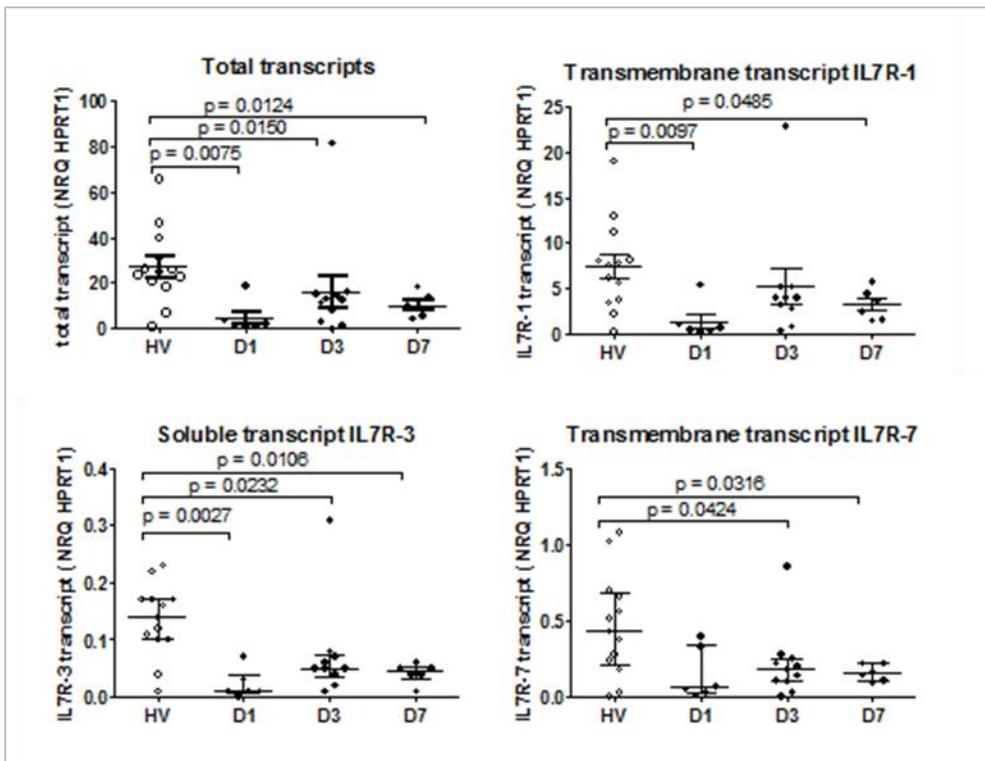
VS n=13 et patients à J1 n =7

**Annexe 4 : Données de MFI brutes des différents nœuds établis par l'outil Cytobank dans la représentation non supervisée SPADE**



(A) Expression des différents marqueurs sur les nœuds sélectionnés sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les VS (n=14) et les patients (n=15). (B) Expression des différents marqueurs sur les nœuds sélectionnés sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez les VS (n=14) et les patients (n=15)

Annexe 5 : mesure des ARNm de l'IL7R à partir de sang total.



VS n=13 et patients à J1 n=6, J3 n=11 et J7 n=6



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.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagée dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

**ALLAM CAMILLE**

**Régulation des différentes formes du récepteur à l'Interleukine-7 et épuisement lymphocytaire T chez les patients atteints de choc septique**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2017, 109 p

**RESUME**

Les syndromes septiques, et notamment le choc septique, s'accompagnent d'une phase immunosuppressive touchant les versants innés et adaptatifs de l'immunité et associée à un mauvais pronostic (mortalité tardive, développement d'infections nosocomiales...).

Actuellement les efforts de recherche thérapeutique portent sur le rétablissement des défenses immunitaires par des agents immunostimulants, notamment par l'interleukine-7. Cette cytokine agit via un récepteur spécifique qui existe sous forme protéique transmembranaire exprimée en surface des lymphocytes T (IL-7R $\alpha$  ou CD127) et sous forme soluble (sCD127). Plusieurs ARNm ont été décrits comme codant pour ces différentes protéines.

Néanmoins, l'étude du récepteur à l'IL-7 au cours du choc septique demeure incomplète. Les objectifs de nos travaux étaient donc d'étudier l'expression des différentes formes protéiques et transcrites du récepteur à l'IL-7 et de relier une modulation de cette expression avec des marqueurs caractéristiques de l'épuisement lymphocytaire T retrouvés dans le sepsis.

Trente et un patients en choc septique et 34 volontaires sains ont été inclus dans l'étude. Nous avons évalué l'expression membranaire du CD127 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> et sur leurs sous-population naïves et mémoires, dosé la concentration plasmatique du sCD127 et évalué l'expression des ARNm du récepteur sur les lymphocytes T isolés. Nous avons aussi évalué des marqueurs d'activation (HLA-DR, CD38) et d'épuisement cellulaire T (expression de PD-1 en surface et diminution du CD127, altération de la production intracellulaire de cytokines).

Nous montrons une expression globalement stable sur les lymphocytes T de patients du récepteur membranaire sous forme protéique et transcrite. En revanche, les ARNm de la forme soluble sont moins exprimés en lien avec la gravité de l'atteinte d'organes. Par ailleurs, les lymphocytes T des patients présentent un phénotype activé avec une augmentation du marqueur HLA-DR, co-exprimé avec un phénotype PD1<sup>hi</sup>/CD127<sup>low</sup>. Ceci est concomitant avec une altération de la synthèse intracellulaire de cytokines, touchant plus sévèrement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Finalement, nos résultats renforcent l'utilisation de l'IL-7 comme traitement immunostimulant dans la phase d'immunosuppression induite par le choc septique et identifient les ARNm de la forme soluble du récepteur à l'IL-7 comme biomarqueurs potentiels de cette immunosuppression. Ils suggèrent également que la régulation du récepteur à l'IL-7 et les altérations des lymphocytes T observées au cours du choc septique seraient le reflet d'un « épuisement induit par l'activation ».

**MOTS CLES**

Choc septique	Immunothérapies
Immunosuppression	Interleukine-7
Epuisement lymphocytaire PD-1	

**JURY**

M. Guillaume MONNERET, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier  
Mme Fabienne VENET, Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier  
Mme Sophie JARRAUD, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier  
M. Olivier THAUNAT, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

**DATE DE SOUTENANCE**

Jeudi 21 Décembre 2017

**ADRESSE DE L'AUTEUR**

127, cours Emile Zola – 69100 Villeurbanne