

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Immunologie, maladies infectieuses

Par

Benjamin GABORIT

Rôle du TNFR2 exprimé par les lymphocytes T régulateurs au cours de l'immunodépression post septique

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 3 juillet 2019

Unité de recherche : EA3826 Thérapeutiques des infections

Rapporteurs avant soutenance :

Natacha Bessis	Professeure des universités, Université Paris 13
Guillaume Monneret	Professeur des universités, Université Lyon 1

Composition du Jury :

Président :	Benoit Salomon	Professeur des universités, Sorbonne Université
Examineurs :	Antoine Roquilly	Professeur des universités, Université de Nantes
Dir. de thèse :	Karim ASEHNOUNE	Professeur des universités, Université de Nantes

REMERCIEMENTS

Madame la Professeure Natacha Bessis et Monsieur le Professeur Guillaume Monneret, merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, trouvez ici l'expression de toute ma gratitude et mon profond respect.

Monsieur le professeur Benoit Salomon, vous me faites l'honneur de juger ce travail, trouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon respect. Merci également pour votre soutien, votre implication constante dès la naissance de ce projet de recherche, votre expertise et vos conseils ont été précieux.

Antoine, merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également pour ton aide, ta disponibilité, et tes relectures toujours pertinentes à chaque avancée de ce projet. C'est une chance d'avoir ton expertise dans notre équipe. Je suis sincèrement admiratif de ta démarche et de ton parcours scientifique et médical.

Karim, tu m'as fait l'honneur d'être mon directeur de master, puis de thèse, depuis maintenant quelques années. Ta patience avec moi est admirable ! Tu fais partie des rencontres qui ont marqué mon parcours personnel et professionnel. Ces années ont été passionnantes et je te serais toujours reconnaissant pour la confiance que tu m'as accordée, pour ta disponibilité et le nombre d'heures incalculables que tu m'as consacré. Je pense que nous partageons la même passion pour ce travail, ta vision scientifique permet au laboratoire d'avancer toujours plus loin, merci !

Alexis, Cédric et Joceline merci pour votre encadrement, vos conseils, votre expertise. Ce travail sans vous n'aurait pas été possible, travailler avec vous est un plaisir.

A Cédric Louvet, merci pour ton aide, tes conseils et ta collaboration essentielle à ce travail.

A Jérémie et Abderrahmane, merci pour votre aide et votre réactivité.

A Benoit Tessoulin, ton aide a été précieuse et surtout ton amitié.

Merci à toute l'équipe de l'EA 3826 composée de personnes passionnées avec lesquelles c'est un plaisir de travailler dans la bonne humeur. Virginie, Marion, Sandie, Jean François, Tanguy, Barbara, Raymonde, je vous remercie de votre soutien.

Mickaël, de la première année de médecine en passant par notre cohabitation en réanimation, comme au laboratoire, c'est toujours un plaisir de travailler avec toi. Bravo pour ton parcours.

Marwan, je suis content que tu te sois lancé dans l'aventure. Anne Gaëlle et toi, bon courage pour la suite de vos travaux au laboratoire.

Mr Raffi, merci de m'avoir accueilli dans votre service et permis de m'épanouir en infectiologie. C'est un honneur pour moi de travailler au quotidien avec vous.

David, merci pour ta confiance et ton soutien quelle que soit la situation. Tu as été et continues d'être un exemple pour des générations d'infectiologue.

A mes collègues :

Merci à toute l'équipe d'infectiologie avec qui j'ai plaisir à travailler au quotidien et qui m'a permis d'organiser mes multiples allers-retours au laboratoire malgré l'activité clinique intense. Merci à Raphael, Paul, Marie, Colin vous êtes plus que des collègues.

Merci à mes anciens collègues de réanimation avec lesquelles j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et à apprendre Delphine, Charlotte, Cédric, Christophe, Noël, Olivier, Laurent, Jean.

Merci également au Pr Hamidou et à l'ensemble de l'équipe de médecine interne nantaise qui m'a formé et constitue à mes yeux une école admirable pour des générations d'interne.

Merci à toute l'équipe d'infirmière et aide-soignante du 7 ième étage de l'hôtel-Dieu, vous faites un travail essentiel, vous avez tout mon respect et mon amitié.

A l'ensemble des collègues que j'ai eu la chance de rencontrer durant ces plus de dix années passées à Nantes, pleines de rencontres marquantes.

A mes proches :

A ma famille et mes amis de si longue date qui font partie de ma famille, Pauline, Jérémie, Julie et Marie. Les années avancent et vous êtes toujours aussi importants à mes yeux. A vos familles respectives qui nous ont si bien porté.

A mes fidèles amis, avec lesquels nous avons partagé tant dans le quotidien qu'à travers nos voyages et aventures lointaines tropicales, David, Florent, Justine, Alexandra et Benoit, François, Emilien, Amélie et Benoit, Lucie et Nicolas.

A mes amis qui me supportent et que j'estime toujours autant Lydie, Amandine, Anne, Julia, Vincent.

A Hai et Thao, à l'autre bout du monde, j'espère bientôt vous revoir à Hanoi.

A la mémoire de mes grands-parents, ainsi que celle de Catherine et Yannick, vous restez avec nous.

A mes parents, merci pour votre soutien de toujours, pour la richesse humaine et intellectuelle dans laquelle vous m'avez élevé et pour tout ce que vous m'avez transmis.

Laura, tu as embelli ma vie, je suis heureux d'avancer et de construire ma vie avec toi. Bientôt, nos nuits seront plus courtes, je m'en réjouis.

SOMMAIRE :

Table des matières

I.	INTRODUCTION	11
II.	Le sepsis	12
1.	Les définitions du sepsis	12
a)	La première définition « Sepsis-1 »	12
b)	La définition actuelle « Sepsis-3 »	12
2.	L'épidémiologie du sepsis.....	15
a)	L'épidémiologie dans le monde et en France	15
b)	L'évolution de la mortalité du sepsis au cours du temps	16
c)	Les principales étiologies de sepsis	17
3.	La physiopathologie du sepsis	18
a)	La réponse inflammatoire initiale : rôles de la réponse immunitaire innée	18
b)	La réponse inflammatoire initiale : l'activation du système immunitaire adaptatif	21
c)	La polarisation de la réponse lymphocytaire T	22
d)	Les essais thérapeutiques ciblant la réponse inflammatoire excessive	24
4.	La physiopathologie du sepsis : L'immunodépression post septique	25
a)	Le concept de l'immunodépression post septique	25
b)	La physiopathologie de l'immunodépression post septique (IS)	26
c)	Les atteintes de l'immunité innée.....	27
d)	Les atteintes de l'immunité adaptative	29
e)	L'activation des lymphocytes Treg	32
f)	Le PICS « Persistent Inflammation, immunosuppression and Catabolism Syndrom »	34
5.	Les marqueurs diagnostiques de l'IS post septique.....	35
a)	Les biomarqueurs de l'IS post-septique	36
b)	Les nouveaux outils de typage haut débit	37
6.	Les essais thérapeutiques	40
a)	Les facteurs de croissance et stimulation du système immunitaire inné : GM-CSF, G-CSF	41
b)	Les facteurs de croissance et stimulation du système immunitaire inné : INFγ et IL-7	41
c)	Le blocage des signaux de costimulation négatifs : PD1-PD-L1	42
d)	Les dangers des inhibiteurs de check point	43
7.	Les modèles animaux utilisés pour l'étude de l'IS post septique.....	45
III.	LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS	46
1.	Historique et description des sous-populations de lymphocytes T régulateurs.....	46
a)	Découverte des lymphocytes T régulateurs	46
b)	Les sous-populations de Treg	47
c)	Les lymphocytes T régulateurs thymiques	49
d)	Les lymphocytes T régulateurs périphériques	49
e)	Les lymphocytes Treg non FoxP3.	50
2.	Les marqueurs phénotypiques de T régulateurs chez la souris et l'homme	50
a)	Chez la souris	51
b)	Chez l'homme	53
3.	Activation des lymphocytes T régulateurs thymiques.....	54
a)	Rôle du TCR.....	54
b)	Rôle de la voie IL2/STAT5 dans l'activation et la stabilité des tTreg	55

c)	Rôle des facteurs de transcriptions nucléaires.	56
4.	Les fonctions effectrices des lymphocytes T régulateurs	57
5.	Le Tumoral Necrosis Factor.....	60
a)	Historique du TNF α	60
b)	Action du TNF- α sur son récepteur TNFR1	62
c)	Action du TNF- α sur les Treg TNFR2	63
IV.	Objectifs	64
V.	Résultats.....	65
VI.	Discussion et perspectives.....	113
VII.	CONCLUSION	123
VIII.	REFERENCES	124
ANNEXE		155

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Définition « sepsis-3 »	13
Figure 2 : Table de calcul du SOFA score	14
Figure 3 : qSOFA.....	14
Figure 4 : L'orage inflammatoire initial.....	18
Figure 5 : Fonctions des cytokines pro-inflammatoires	19
Figure 6 : Rôles et spécificités des TLR au cours du sepsis	20
Figure 7 : La synapse immunitaire.....	21
Figure 8 : Polarisation de la réponse lymphocytaire T	23
Figure 9 : Essais cliniques à visée anti-inflammatoire au cours du sepsis	24
Figure 10 : Résumé des mécanismes d'immunosuppression post septique	26
Figure 11 : Résumé des principales atteintes de l'immunité innée et adaptative au cours de l'IS ...	26
Figure 12 : Résumé des atteintes de l'immunité innée au cours de l'IS	27
Figure 13 : Les atteintes de l'immunité adaptative au cours de l'IS	29
Figure 14 : Concepts de profils de réponses au sepsis	35
Figure 15 : Théorie du classement par endotype du sepsis	37
Figure 16 : Les nouvelles stratégies de classifications du sepsis.....	39
Figure 17 : Analogie entre l'échappement immunitaire au cours du cancer et du sepsis	42
Figure 18 : Les principaux effets indésirables des biothérapies.....	43
Figure 19 : Les principales atteintes d'organe dans le cadre de la toxicité des biothérapies	44
Figure 20 : Historique de la découverte des Treg.....	47
Figure 21 : Les sous types de lymphocytes Treg.....	48
Figure 22 : Voies de stimulation intracellulaire permettant l'activation des lymphocytes Treg.....	55
Figure 23 : Les mécanismes d'action des Treg	57
Figure 24 : La « superfamille du TNF »	61
Figure 25 : Voie de signalisation intracellulaire du TNF α	62
Figure 26 : Modèle d'IS post septique.....	71
Figure 27 : Détermination de l'inoculum de <i>S. aureus</i>	72
Figure 28 : Sepsis à <i>S. aureus</i> caractérisé par une bactériémie	72
Figure 29 : Activation lymphocytaire et des cellules dendritiques au cours du sepsis.	73
Figure 30 : Réponse pro-inflammatoire systémique induite par le sepsis	73
Figure 31 : Œdème lésionnel induit par le sepsis	74
Figure 32 : La pneumopathie secondaire au sepsis s'accompagne d'une plus grande sévérité clinique qu'une pneumopathie seule	75
Figure 33 : Baisse de la réponse pro-inflammatoire au cours de la pneumopathie secondaire en comparaison d'une pneumopathie seule	75
Figure 34 : Baisse de la réponse neutrophilique au cours de la pneumopathie secondaire en comparaison d'une pneumopathie seule.	76
Figure 35 : Absence d'impact de l'IS sur les charges bactériennes pulmonaires précoce au décours de la pneumopathie.....	77
Figure 36 : L'IS dans notre modèle est associée à un phénomène d'épuisement lymphocytaire induit par le sepsis	77

Figure 37 : L'IS post septique est associée à une baisse des capacités d'activation et de prolifération lymphocytaire T in vivo	78
Figure 38: Lymphopénie CD4+ au cours de l'IS post sepsis	81
Figure 39: Persistance du nombre de Treg et augmentation ratio Treg/TCD4+ au cours du sepsis..	82
Figure 40: Analyse supervisée en cluster des gènes différentiellement exprimés	83
Figure 41: La signature des Treg au cours du sepsis dans notre modèle	83
Figure 42: Les principales voies biologiques activées par le sepsis chez les Treg	84
Figure 43: Les principales voies biologiques activées chez les Treg au cours de l'IS	85
Figure 44: Phénotype de Treg effecteurs induits par le sepsis	86
Figure 45: L'implication des voies TNF/NFkB et IL2/stat5.....	88
Figure 46: L'activation des lymphocytes Treg au cours du sepsis	89
Figure 47: Contrôle de la déplétion efficace en Treg par la Toxine diptérique en condition de sepsis	89
Figure 48: La restauration des capacités fonctionnelles lymphocytaires T secondaire à la déplétion des Treg au cours de l'IS	90
Figure 49: La déplétion à la phase précoce du sepsis des Treg s'accompagne d'une augmentation des marqueurs d'activation des lymphocytes T effecteurs (TCD4+FoxP3-)	91
Figure 50: la déplétion des Treg à la phase précoce de l'IS s'accompagne d'une diminution d'expression de PD1 sur les lymphocytes T CD4+Foxp3 et d'une restauration de l'afflux en polynucléaire à la suite de la pneumopathie	92
Figure 51 : Le TNFR2 est majoritairement exprimé par les Treg	93
Figure 52: Le sepsis s'accompagne d'une augmentation du pourcentage et du nombre de lymphocytes Treg TNFR2	94
Figure 53: Analyse supervisée en cluster des gènes différentiellement exprimés entre les TregTNFR2+ et Treg TNFR2- au cours du sepsis	94
Figure 54: Analyse des variances d'expression génique chez les TregTNFR2+ et Treg TNFR2- au cours du sepsis	95
Figure 55 : Clusters géniques permettant de différencier nos populations de Treg	96
Figure 56: Volcano plot (panel du haut) exprimant les gènes des TregTNFR2+ et Treg TNFR2- au cours du sepsis	97
Figure 57: Heat map de gènes de la signature eTreg chez les TregTNFR2+	98
Figure 58 : Représentation par analyse ontologique de processus biologique du niveau d'expression d'ensemble de gènes surexprimés par les Treg TNFR2+	99
Figure 59: Heat map de gènes inhibiteurs d'apoptose chez les TregTNFR2+	99
Figure 60: analyse de l'enrichissement de la voie IL-2/STAT5	100
Figure 61: Expression du CTLA4 intracellulaire exprimé chez les TregTNFR2+	101
Figure 62: Ratio Treg/T CD4+ chez les souris TNFR2KO au cours du sepsis	101
Figure 63: CTLA4 intracellulaire exprimé chez les Treg des souris TNFR2KO	102
Figure 64: Persistance de la prolifération lymphocytaire T in vivo chez les souris TNFR2KO au cours du sepsis	102
Figure 65: Correction de la lymphopénie par le traitement anti-TNFR2 au cours du sepsis	103
Figure 66: Restauration de la prolifération lymphocytaire T in vivo par les anti-TNFR2	104
Figure 67: schéma expérimental du traitement par anti-TNFR2 au cours du modèle double hit. ..	105
Figure 68: Restauration de l'afflux en PNN par le traitement par anti-TNFR2	105

Figure 69: Augmentation du ratio Treg/TCD4+ induit par la stimulation directe de PBMC par S. aureus.....	107
Figure 70: Activation des TregTNFR2+ induites par la stimulation directe de PBMC par S. aureus.....	108
Figure 71 : Analyse du ratio Treg/T CD4+ en fonction des différentes définitions de Treg sur une population prise en charge pour choc septique	110
Figure 72: Induction d'expression de CTLA4 spécifique des Treg TNFR2+ chez les patients pris en charge pour choc septique	111
Figure 73: Augmentation d'expression de Foxp3+ dans les rates des patients les plus inflammatoires.....	112
Figure 74 : Hypothèse de travail sur le rôle des lymphocytes Treg TNFR2 au cours du sepsis	123
 Tableau 1 : Définitions des Treg au cours du sepsis.....	 33
Tableau 2 : Agents thérapeutiques à l'étude pour le traitement de l'IS post-septique.....	40
Tableau 3 : Synthèse des marqueurs différenciellement exprimés chez le cTreg et eTreg.....	52
Tableau 4 : Caractéristiques de 10 patients septiques de la biocollection IBIS-sepsis	109

LISTE DES ABREVIATIONS

AIRE : Auto-Immune REgulator

ARNm : Acide RiboNucléique Message

ATP : Adénosine Tri Phosphate

BCL-2 : Anti-apoptotic factor B Cell Lymphoma 2

BGN : Bactérie à Gram Negative

Blimp-1 : B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1

BTLA : B and T lymphocyte Attenuator

CARS : Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome

CCL : CC-chemokine Ligand

CD : Cluster of Differentiation

Cellules NK : Natural Killer

CGP : Cocci à Gram Positif

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CRP : C Reactive Protein

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-Associated protein 4

CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand

DAMPS : Damage-Associated Molecular Patterns

DC : Cellules Dendritiques

eTreg : Treg effecteurs

FoxP3 : Forkhead box P3

GATA3 : GATA-binding protein 3

GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GZM : Granzyme

HLA : Human Leucocyte Antigen

HLA-DR : Human Leukocyte Antigen – DR isotype

ICOS : Inductible T-cell COStimulator

IDO : Indoléamine 2,3 DiOxygénase

IFN : Interféron

IL : Interleukine

INF γ : Interferon gamma

IPEX : Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome

IRF : Interferon Receptor

IS : Immunodepression post Septique

iTreg : Treg induit

JAKs : Janus Kinases

Lag-3 : Lymphocyte Activation Gene-3

LPS : lipopolysaccharide

MAPKs : Mitogen-Activated Protein Kinases

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

miRNA : micro ARN

MMP : Métalloprotéinase

mTNF α : TNF α membranaire

NF- κ B : Nuclear translocation of nuclear Factor κ B

NK : Natural Killer

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell, cellules mononucléées du sang

PD-1 : Programmed cell death protein 1

PD-L1 : programmed death-ligand 1

PICS : Persistent Inflammation, immunosuppression and Catabolism Syndrome

PNN : Polynucléaire Neutrophile

pTreg : Treg périphérique

qSOFA : Quick SOFA

RANK : Receptor Activator of NFκB

RANKL : Receptor Activator of NFκB Ligand

RORγT : Retinoic acid-related Orphan Receptor Gamma T

ROS : Reactive Oxygen-Species

SOFA : Sepsis-related Organ Failure Assessment

SRIS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique

STATs : Signal Transducers and Activators of Transcription

sTNFα : TNFα soluble

T-bet : T-box expressed in T cells

Tconv : lymphocytes T conventionnel

TCR : T Cell Receptor, récepteur des cellules T

Teff : Lymphocyte T effecteur

TGFβ : Transforming Growth Factor β

Th : T helper

TIM-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3

TLR : Toll-Like Receptor, récepteur de type Toll

TNFR : TNFα receptor, récepteur du TNFα

TNFα : Tumor Necrosis Factor α

TRADD : Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein

TRAF : TNF Receptor Associated Factor

Treg : lymphocytes T régulateur

tTreg : Treg thymique

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

I. INTRODUCTION

Le processus infectieux correspond à l'invasion de l'hôte par un pathogène puis à sa prolifération. La réponse de l'hôte implique successivement les acteurs de l'immunité innée puis adaptative pour permettre une réponse anti-infectieuse efficace tout en maintenant l'homéostasie tissulaire et cellulaire. La reconnaissance des pathogènes et des signaux de danger issus de ceux-ci comme les « PAMP » (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) par les récepteurs « PRR » (*Pattern Recognition Receptor*), dont les plus étudiés sont les « TLR » (*Toll Like Receptor*) exprimés à la surface des macrophages et des cellules dendritiques (DC), permet d'initier l'expression des cytokines pro-inflammatoires, Interleukine-1 (IL-1), IL-6, IL-12, CXCL8 et Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α). Ces cytokines permettent d'amplifier la réponse pro-inflammatoire, le recrutement des neutrophiles et l'activation du complément. Lorsque cette réponse est insuffisante, la réponse adaptative est alors activée par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et la présentation d'antigène spécifique du pathogène aux cellules de l'immunité adaptative. Le déploiement de la réponse immunitaire T effectrice est alors essentiel à une réponse adaptée spécifique des pathogènes incriminés.

Malgré les progrès réalisés ces vingt dernières années dans la prise en charge médicale du sepsis, ces infections restent grevées d'une mortalité intra-hospitalière de 10 à 20 % (Singer et al., 2016). De plus, 20 à 30 % des patients qui ont survécu à la phase initiale du sepsis vont mourir durant les premières années suivantes (Linder et al., 2014). Cette surmortalité n'est expliquée qu'en partie par l'intensité de la réponse inflammatoire initiale responsable de défaillances d'organes, ainsi que par la décompensation de comorbidités chez des patients septiques plus âgés qu'auparavant. L'équilibre entre une réponse immunitaire efficace, l'éradication du pathogène tout en respectant les capacités physiologiques de l'organisme est donc l'un des déterminants majeurs du pronostic précoce et tardif au cours du sepsis. Par ailleurs, le sepsis impacte de manière prolongée les capacités de défense du système immunitaire face à une agression secondaire, définissant un état d'immunodépression secondaire post septique (IS). Cette IS post septique est responsable d'une morbi-mortalité tardive non négligeable. Au cours des infections bactériennes sévères, la mise en place rapide d'une réponse anti-inflammatoire compensatrice permet le maintien de l'homéostasie immunitaire et le contrôle local et systémique de cet « orage inflammatoire ». Une polarisation excessive précoce vers un état hyperinflammatoire ou une immunodépression excessive est pourvoyeuse de surmortalité (Boomer et al., 2011). Dans le cas de l'IS post-septique, il est décrit une réponse anti-inflammatoire touchant à la fois les acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (Boomer et al., 2012)(Venet et al., 2013a), associée à un phénomène « d'épuisement lymphocytaire » semblable à celui observé en cancérologie avec l'expression membranaire de Programmed cell death protein 1 (PD-1) et de cytotoxique T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) (Chang et al., 2013a). Cette immunodépression

post-infectieuse est associée à un mauvais pronostic (Linder et al., 2014). La spécificité de ces désordres immunologiques ne semble pas seulement en lien avec la sévérité (état hyper inflammatoire initial) mais varie également en fonction du type de pathogène responsable du sepsis (Mina et al., 2015).

Le développement de thérapies personnalisées immunomodulatrices au cours du sepsis est un axe de recherche en plein essor qui pourrait constituer un enjeu majeur pour améliorer le pronostic de ces patients.

II. Le sepsis

1. Les définitions du sepsis

Du philosophe Avicenne (Majno, 1991) à nos jours, Boerhaave, Pasteur, Lister et Bone ont contribué à une meilleure compréhension du sepsis. Les avancées thérapeutiques majeures de ces trente dernières années ont été permises par une définition plus précise de cette entité clinique, qui a évolué avec la compréhension des mécanismes physiopathologiques complexes engagés au cours du sepsis.

a) La première définition « Sepsis-1 »

Afin d'améliorer les pratiques et de standardiser les protocoles de recherche clinique, la première définition consensuelle du sepsis a été proposée lors de la conférence nord-américaine de l'American College of Chest Physicians et la Society Care Medicine (SCCM) de 1991 (Bone et al., 1992). Le sepsis est pour la première fois défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) en réponse à une infection microbienne. Le SRIS est défini par l'association d'au moins 2 critères parmi une hyper ou hypothermie, une tachycardie, une polypnée et une hyperleucocytose (ou leucopénie). Le sepsis sévère associe un sepsis et une défaillance d'organe. Le sepsis sévère peut se compliquer d'un état de choc septique caractérisé par une hypotension artérielle résistante à un remplissage vasculaire adéquat, pouvant s'accompagner d'acidose lactique. Ces stades cliniques sont décrits comme un continuum corrélé à la gravité et la mortalité.

b) La définition actuelle « Sepsis-3 »

Le SRIS est un syndrome peu spécifique du sepsis, pouvant être rencontré au cours de multiples pathologies. À partir de 2001, La définition « sepsis-1 » commence à être rediscutée du fait de son manque de spécificité, par l'American College of Chest Physicians et la Society Care Medicine (SCCM)

lors de la réactualisation de la définition « Sepsis-2 ». Les modifications de la définition restent alors mineures par manque de données cliniques suffisamment validées.

Le manque de valeur prédictive positive du SRIS comme facteur de mortalité (Churpek et al., 2015) conduit à de nouvelles définitions du sepsis en 2016. Sur la base d'études récentes et de larges métaanalyses, les critères de SRIS et sepsis sévères sont exclus de la nouvelle définition. Le sepsis est alors défini comme étant une infection avec réponse « dérégulée » de l'hôte s'accompagnant de dysfonctions aigües d'organes traduit par un score SOFA ≥ 2 (Sepsis-related Organ Failure Assessment) responsable de 10% de mortalité hospitalière (Singer et al., 2016). Le choc septique est défini comme un sepsis avec un risque majeur de décès (40%). Plus précisément, le choc septique est donc un sepsis avec hypotension artérielle persistante malgré un remplissage vasculaire, nécessitant l'utilisation d'amines vasoactives associé à un dosage de lactate ≥ 2 mmol/L, reflet d'une hypoperfusion d'organe.

Ces nouvelles définitions soulignent le rôle central de la dysfonction immunitaire au cours du sepsis dont la traduction clinique est la dysfonction d'organes, l'hypoperfusion tissulaire (augmentation des lactates) et une hypotension artérielle rebelle au remplissage vasculaire dans sa forme la plus sévère (choc). La réponse immunitaire « dérégulée » peut être directement génératrice de dysfonctions d'organes secondaires. Elle différencie également le sepsis et le choc septique comme deux entités indépendantes, déterminées par un mécanisme inadapté de réponse immunitaire et non comme un simple continuum.

La seconde avancée permise par ces définitions est l'identification plus précoce des patients à risque de décès hospitalier avec la recherche rapide de dysfonctions d'organes induites par la réponse immunitaire. Le score SOFA est un score de gravité calculé en réanimation à partir de critères cliniques et biologiques permettant d'évaluer les dysfonctions d'organes (**fig. 1**) corrélé à la mortalité (Vincent et al., 1996).

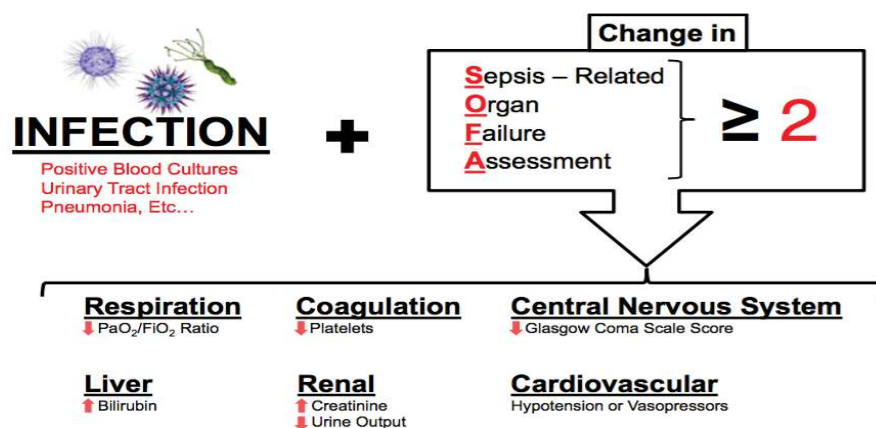


Figure 1 : Définition « sepsis-3 » (Singer et al., 2016)

Son calcul nécessite cependant la réalisation d'un bilan biologique et une table de calcul (**fig2**). Pour faciliter la détection des patients à risque de sepsis en dehors des unités de soins intensifs, une version simplifiée du SOFA score est proposée, le « Quick SOFA » (qSOFA) (**Fig.3**).

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
Pao ₂ /Fio ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular					
MAP ≥70 mm Hg		MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Abbreviations: Fio₂, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; Pao₂, partial pressure of oxygen.

^a Adapted from Vincent et al.²⁷

^b Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

^c Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.

Figure 2 : Table de calcul du SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment Score, le sepsis est défini par un score ≥2 points ou +2 points par rapport au SOFA initial (Singer et al., 2016).



Figure 3 : qSOFA, Glasgow ≤14/15 (+1 point), fréquence respiratoire ≥22/min (+1 point), tension artérielle systolique ≤100 mm Hg (+1 point). Un score qSOFA ≥2 points doit faire craindre un sepsis et calculer un SOFA score (Singer et al., 2016).

Le qSOFA est calculé selon un algorithme à partir de données cliniques simples, la fréquence respiratoire ≥22/min (+1 point), une altération du score Glasgow ≤14 (+1 point), une hypotension artérielle systolique ≤ 100 mm Hg (+1 point). Après addition des trois items, un qSOFA ≥ 2 est un paramètre d'alerte devant faire réaliser un bilan complémentaire pour calculer un score SOFA et rechercher un sepsis. Le sepsis est une urgence diagnostique et thérapeutique, la précocité du

traitement antibiotique efficace, associée aux mesures de réanimation sont associés à l'amélioration du pronostic vital des patients en choc septique (Angus et al., 2001) (Dellinger et al., 2013).

Depuis plus de 20 ans, les progrès dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis, de la reconnaissance par le système immunitaire inné des pathogènes (Le and Vilcek, 1989) (Dinarello, 1984) (Beutler and Cerami, 1989) ainsi que les mécanismes de la réponse inflammatoire (Matzinger, 1994) ont permis d'améliorer le pronostic. La reconnaissance précoce du sepsis et les progrès des soins de réanimation ont permis de considérablement diminuer la mortalité précoce de cette entité (Kaukonen et al., 2014) (Ferrer et al., 2008) (Levy et al., 2015).

Cependant, sa physiopathologie est complexe et ne résume pas à une réponse inflammatoire exacerbée. Elle inclut l'activation du complément, de la coagulation (responsable d'une atteinte directe de la microcirculation) (Opal and van der Poll, 2015), et une réponse anti-inflammatoire compensatrice pouvant devenir elle-même délétère.

2. L'épidémiologie du sepsis

a) L'épidémiologie dans le monde et en France

A l'échelle mondiale, l'incidence et prévalence du sepsis reposent sur l'extrapolation de données issus des pays développés. Environ 31,5 millions de cas de sepsis surviennent chaque années dans le monde avec 5,3 million de décès imputable (Fleischmann et al., 2016a) (Murray and Lopez, 2013). Le nombre d'hospitalisations pour sepsis est en augmentation depuis ces 30 dernières années. En Australie (Sundararajan et al., 2005), comme aux Etats Unis (Seymour et al., 2010) (Martin et al., 2003) et en France, l'incidence des hospitalisations pour sepsis augmente, passant de 27 à 41 % (considérés comme sepsis sévère selon « Sepsis-1 ») (Fleischmann et al., 2016b). Cette augmentation peut correspondre à l'augmentation de la proportion de personnes fragiles, favorisée par le vieillissement de la population (Angus et al., 2001). Les progrès réalisés en oncohématologie et en transplantation d'organes solide s'accompagnent également de l'augmentation du nombre de patients d'immunodéprimés (Fishman and Issa, 2010). Les facteurs d'immunodépression, comme les âges extrêmes, le sexe masculin et les comorbidités sont également identifiés comme des facteurs de risque associés au développement d'un sepsis (Angus et al., 2001). En France, l'incidence du sepsis est évalué à 95 cas/100 000 habitants par an (Brun-Buisson et al., 1995) (Quenot et al., 2013) (Galbois et al., 2014).

Du fait des variations des critères diagnostiques du sepsis au cours du temps, ces extrapolations peuvent prêter à discussion (Gaieski et al., 2013). Malgré un risque de surestimation, le sepsis est devenu aux états unis un recours d'hospitalisation plus fréquent que les maladies cardio-vasculaires et de cancer du seins réunis (Fleischmann et al., 2016b)

b) L'évolution de la mortalité du sepsis au cours du temps

Les études de registre sont en faveur d'une diminution de la mortalité précoce imputable au sepsis (McPherson et al., 2013). Ces données sont concordantes avec celles publiées en Australie et en Nouvelles Zélande (Kaukonen et al., 2014). En France, la mortalité du sepsis à 28 jours a diminuée de 20% ces 30 dernières années (Pavon et al., 2013).

Sur le plan épidémiologique, le différentiel entre l'augmentation d'incidence globale du sepsis et la diminution de sa mortalité hospitalière, reste défavorable (Martin et al., 2003). Le taux de mortalité du sepsis avec les nouvelles définitions de sepsis-3 est estimé à 10% et de l'ordre de 30 à 40% pour le choc septique (Singer et al., 2016).

Les facteurs de risque de décès attribuables au sepsis sont les critères de sévérité (SOFA score)(Mayr et al., 2010), ainsi que le retard à l'initiation d'une antibiothérapie efficace et à la correction des défaillances d'organes. Le contrôle rapide de la source de l'infection (Rivers et al., 2001), les facteurs de virulence de la bactérie en cause, les susceptibilités (immunitaires et génétiques) de l'hôte (Jamme et al., 2017) sont également des déterminants majeurs de la mortalité précoce. Les facteurs de fragilité des patients comme l'âge, le nombre des comorbidités et l'immunodépression sont à la fois des facteurs de risque de décès précoces (Daviaud et al., 2015) et tardifs (Pavon et al., 2013).

Les causes de décès précoces du sepsis (dans les 4 premiers jours) sont essentiellement secondaires aux manifestations hyperinflammatoires (défaillance multiviscérale). A la phase tardive, ce sont les infections nosocomiales et la décompensation de comorbidités qui prédominent (Daviaud et al., 2015). Ces descriptions cliniques démontrent l'impact majeur sur le pronostic tardif des phénomènes d'immunodépression (IS) post septique (Stortz et al., 2018) (Prescott et al., 2016) (Landelle et al., 2008). Parmi les complications de cette IS post septique, les infections secondaires sont estimées à 15 à 20% (van Vught et al., 2016) et sont responsables d'une surmortalité de plus de 10% à 60 jours (Gayat et al., 2018).

L'augmentation du nombre de patients survivants au sepsis s'accompagne de l'émergence d'une nouvelle population de patients « convalescents ». Ces patients sont porteurs de désordres immunologiques persistants, favorisant des complications secondaires, cardiovasculaires (Musher et

al., 2019) , oncologiques (Liu et al., 2019) et des séquelles fonctionnelles (Iwashyna et al., 2010) (Yende et al., 2016).

Les facteurs associés à la survenue d'une infection nosocomiale au décours du sepsis sont la sévérité initiale du sepsis, les stigmates biologiques d'IS post septique et la présence de dispositifs invasifs (van Vught et al., 2016), alors que la présence d'une immunodépression préalable (cancer, hémopathie, transplantation d'organe) ne semble moins en cause (Jamme et al., 2017).

c) Les principales étiologies de sepsis

Les pneumopathies représentent plus de 50% des étiologies de sepsis, suivies des infections abdominales et urinaires (Angus and van der Poll, 2013) (Levy et al., 2012), le plus fréquemment communautaire.

Dans plus d'un cas sur deux la documentation bactériologique de la cause du sepsis est négative. Les hémocultures ne sont positives que dans un tiers des cas (Opal et al., 2003) et seul 40% des pneumopathies hospitalisées sont documentées (Jain et al., 2015). Jusqu'aux années 2000, les sepsis documentés sur le plan microbiologique étaient le plus souvent secondaires à des bactéries à gram positif (Martin et al., 2003). Les études plus récentes retrouvent quant à elles une augmentation des sepsis à bactéries à gram négatif, avec 60% de BGN (bacille gram négatif) parmi les hémocultures positives, 47% de cocci gram positifs et 19% d'agents fongiques.

Parmi les cocci gram positifs, les *Staphylococcus aureus* et les *Streptococcus pneumoniae* sont les plus souvent isolés. Alors que parmi les bacilles gram négatifs, ce sont les *Escherichia coli*, *Klebsiella* et le *Pseudomonas aeruginosa* (Ranieri et al., 2012) qui sont le plus souvent retrouvés.

3. Physiopathologie du sepsis

a) Le rôle de la réponse immunitaire innée

Les symptômes précoces qui caractérisent le sepsis sont une manifestation de l'hyper activation du système immunitaire inné responsable d'une réponse pro-inflammatoire excessive.

La détection des pathogènes induit la production locale de nombreux médiateurs cytokiniques pro-inflammatoires dont le $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β , IL-12, CXCL8. Ces cytokines permettent l'afflux de cellules immunitaires innées, les neutrophiles, les basophiles, ainsi que l'activation des cellules endothéliales facilitant la diapédèse et la perméabilité vasculaire. Ces médiateurs ont également un effet systémique et sont responsable de l'hyperthermie, de la tachycardie et des signes cliniques définissant le « SRIS » (Fig4).

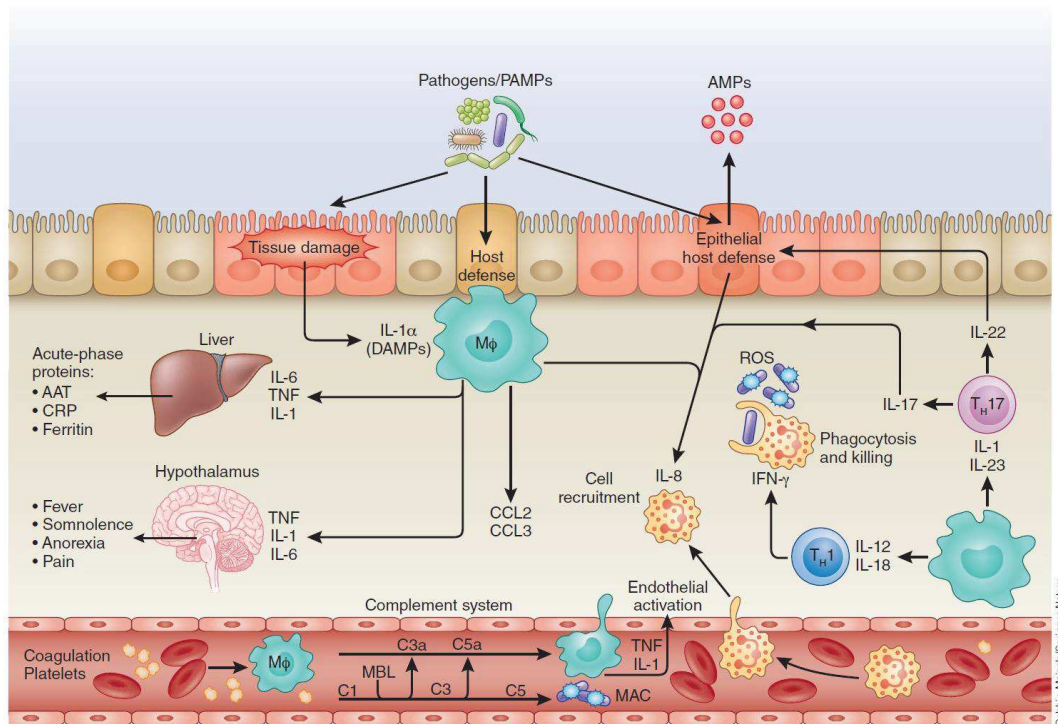


Figure 4 : L'orage inflammatoire initial lors de la détection du pathogène (Netea et al., 2017)

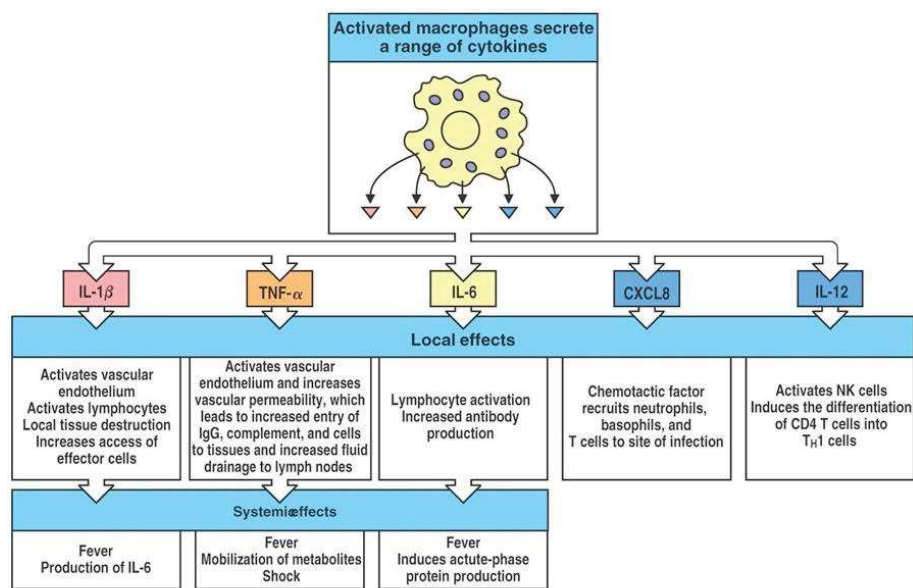


Figure 2-39 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Figure 5 : Fonctions des cytokines pro-inflammatoires (Murphy, K. et al. Janeway's immunobiology)

Par son rôle de veille constante, le système immunitaire inné agit comme un gardien de l'intégrité de l'hôte. Il est capable de reconnaître de nombreux signaux de danger issus des pathogènes eux-mêmes, de dommages secondaires à la réaction inflammatoire, de signaux endogènes médiés par le complément et autres cellules du système immunitaire (Takeuchi and Akira, 2010).

La réponse inflammatoire est initiée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les neutrophiles (PNN), les cellules épithéliales et endothéliales (Bierhaus and Nawroth, 2003). Elles reconnaissent les motifs associés aux microorganismes pathogènes (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns), ainsi que les signaux de dangers (DAMPs, damage-associated molecular patterns), par les TLR, les récepteurs de type lectine C, nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor, retinoic acid-inducible gene (RIG)-like receptor, mannose-binding lectin receptors (Tang et al., 2012) (**Figure 6**).

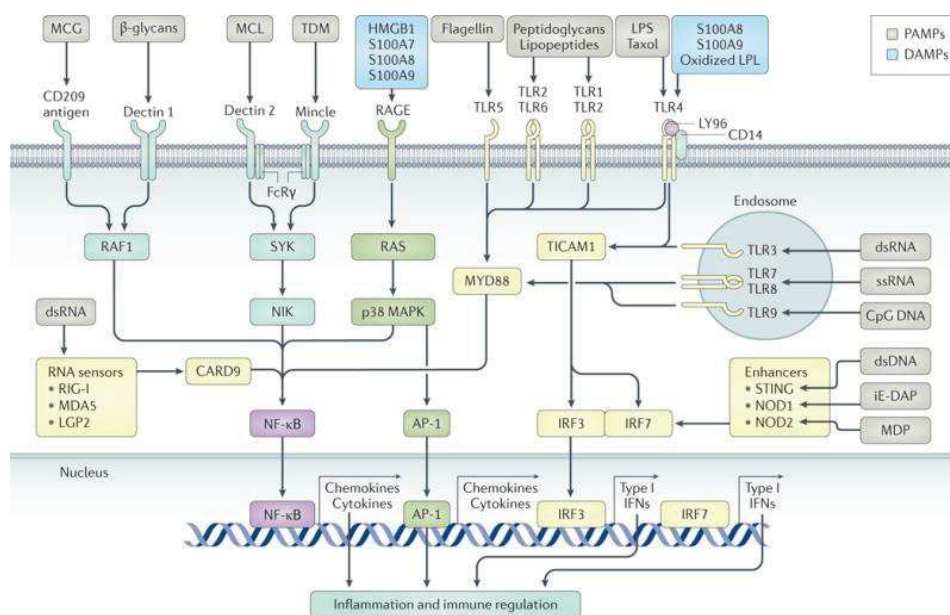


Figure 6 : Rôles et spécificités des TLR au cours du sepsis (Angus and van der Poll, 2013)

L'activation de ces récepteurs conduit à l'activation des voies de signalisation MAPKs (mitogen-activated protein kinases), JAKs (Janus Kinases), STATs (signal transducers and activators of transcription) et NF-κB (nuclear translocation of nuclear factor κ B).

Ces voies de signalisation intracellulaire aboutissent à l'expression des cytokines pro- inflammatoires TNF, IL-1, IL-12, IL-18, interféron (IFN) de type I et II. Il s'agit ensuite d'une réaction en cascade qui induit « un orage cytokinique ». En effet, la réaction s'amplifie avec l'hyperproduction d'autres cytokines et chemokine comme l'IL-6, IL-8, CC-chemokine ligand2 (CCL2), CCL3, CXCL10, ainsi que l'activation du complément et de la coagulation (thrombomoduline, facteur tissulaire, facteur von Willebrand, plasminogène, PAI-1). L'activation précoce du complément au cours du sepsis, via le C3a puis du C5a, joue un rôle de puissant chimio attractant des polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages. L'afflux des cellules immunitaires permet la production d'espèces réactives de l'oxygène nécessaire à la bactéricidie mais également responsable de lésions secondaires tissulaires (Ward, 2010) contribuant à l'amplification de la réponse inflammatoire et à l'entretien de cette boucle pro-inflammatoire autodestructrice.

b) L'activation du système immunitaire adaptatif au cours du sepsis

Cette réaction pro-inflammatoire conduit à l'activation des CPA, qui seront à l'origine de l'activation des lymphocytes T et des lymphocytes B spécifiques du pathogène au sein des organes lymphoïdes secondaires. Leur activation, contrairement aux cellules de l'immunité innée, nécessite la reconnaissance spécifique par leur récepteur TCR ou BCR de l'antigène présenté par le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) des CPA. L'activation des lymphocytes T s'effectue après la formation de la synapse immunologique au sein de laquelle des signaux d'activation successifs conduiront à l'activation lymphocytaire, par l'interaction du TCR avec le CMH couplé à l'antigène, l'interaction des corécepteurs activateur dont le CD80, CD86 de la CPA avec le CD28 lymphocytaire permettant l'expression de l'IL-2 aux effets activateurs autocrines et exocrines (**Fig. 7**). Les lymphocytes T activés se différencient et migrent vers les follicules de cellules B des ganglions lymphatiques et spléniques où ils peuvent participer à l'activation des lymphocytes B. Les lymphocytes T expriment alors un phénotype effecteur. L'expression membranaire de récepteurs de chimiokines inflammatoires (homing) déterminent leur migration vers le site d'infection primaire.

Les lymphocytes B naïfs nécessitent également un double signal activateur (1) par la reconnaissance spécifique par leur BCR de l'antigène spécifique associé à (2) une co-activation par les lymphocytes T activés. Leur activation induit leur prolifération et leur maturation en plasmocytes capables d'exprimer des anticorps spécifiques. Cette réponse adaptative spécifique renforce la réponse innée et s'accompagne de mécanismes de régulations complexes.

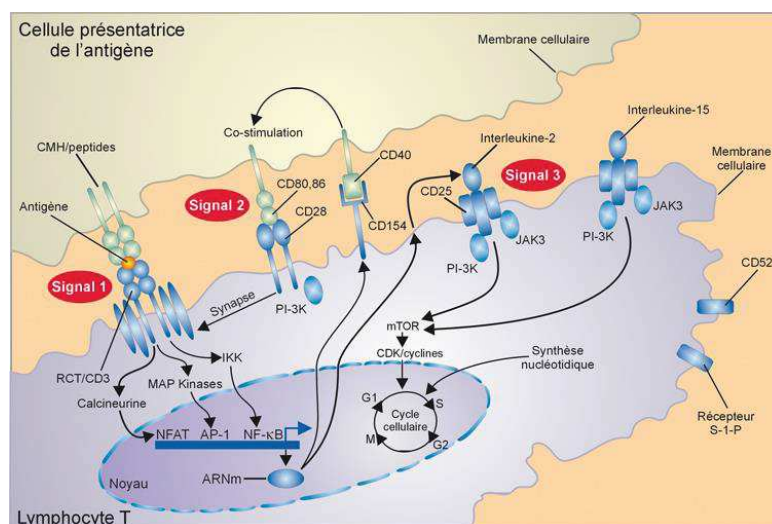


Figure 7 : La synapse immunitaire permettant l'activation lymphocytaire T (d'après Halloran, 2004)

c) La polarisation de la réponse lymphocytaire T

Les lymphocytes T après leur activation, qui est sous la dépendance du micro-environnement cytokinique vont se différencier en sous population lymphocytaire T. Les lymphocytes T helper de type 0 (Th0) prolifèrent et se polarisent en sous-population T effectrice aux fonctions très différentes : les lymphocytes Th1, Th2, Th17 et les lymphocytes T régulateurs (Treg) (**Fig.8**).

La différenciation en lymphocytes T helper de type 1 (Th1) est favorisée par la prédominance d'IL-12 et l'interféron- γ (INF γ) exprimées par les CPA dans le microenvironnement et sous la dépendance du facteur de transcription T-box expressed in T cells (T-bet). Les Th1 expriment principalement de l'INF γ et d'IL-2, permettant l'activation des cellules de l'immunité innée (Lee et al., 2006), des lymphocytes B et T CD8+ cytotoxiques (Murphy and Reiner, 2002). La voie Th1 renforce ainsi les capacités phagocytaires des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), la production de cytokines pro inflammatoires et participe au renforcement de l'immunité cellulaire contre les micro-organismes intracellulaires.

La polarisation vers la réponse Th2 est favorisée par la présence d'IL-4 dans le microenvironnement. Elle est sous la dépendance du facteur de transcription GATA-3. Les lymphocytes Th2 renforcent la réponse humorale par la production d'IL-4, IL-5, IL-13 et l'activation des cellules B (Pearce et al., 2012). La réponse Th2 coordonne également la réponse immunitaire médiée par les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes contre les pathogènes extracellulaires et les parasites. Cette réponse immunitaire permet le renforcement des barrières immunitaires et épithéliales.

La polarisation vers la réponse Th17 est favorisée par un microenvironnement riche en Transforming Growth Factor beta (TGF β) et IL6. La différenciation en lymphocytes Th17 est sous la dépendance du facteur de transcription Retinoic acid-related orphan receptor gamma t (ROR γ T). Ces lymphocytes favorisent le recrutement des neutrophiles par l'expression d'IL-17A, IL-17F, IL-22 et IL-6 (Ivanov et al., 2006). Ils permettent ainsi de renforcer la réponse contre les bactéries extracellulaires à multiplication rapide et les agents fongiques invasifs.

Les lymphocytes T régulateurs assurent quant à eux un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie des cellules immunitaires, le contrôle de la réponse inflammatoire et la cicatrisation.

Les mécanismes de différenciation en sous type lymphocytaire T nécessitent l'expression de facteurs de transcription distincts qui sont interdépendants. Le facteur de transcription T-bet lorsqu'il est exprimé se lie à GATA3 et réprime son expression, ce qui limite la différenciation de la voie Th2 au profit de la voie Th1.

Le facteur de transcription GATA3 inhibe STAT4, impliqué dans la différenciation Th1 (Usui et al., 2003). En interférant avec ROR γ T, FoxP3 est quant à lui antagoniste de la différenciation Th17. Réciproquement ROR γ T en se liant à la région promotrice du gène FoxP3 limite l'expression de FoxP3 (Mantel et al., 2007) (Burgler et al., 2010).

Ces sous-populations T helper interagissent et un équilibre s'établit, les caractéristiques de l'hôte et du pathogène déterminent ces réactions complexes aboutissant à une polarisation de la réponse immunitaire adaptative avec des « balance Th1/Th2 » et « Th17/Treg » variables. Le déséquilibre de l'une ou l'autre de ces balances est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses pathologies inflammatoires : les maladies auto-immunes sont fréquemment associées à une réponse Th1 excessive, l'asthme à une polarisation Th2, le lupus à une orientation excessive Th17, le cancer à une réponse Treg excessive.

Quand la réponse inflammatoire s'achève, la plupart des cellules spécifiques d'antigène activées entre en apoptose. Quelques cellules survivantes deviennent des cellules mémoire quiescentes, prêtes à une nouvelle réponse plus rapide en cas de nouvelle agression.

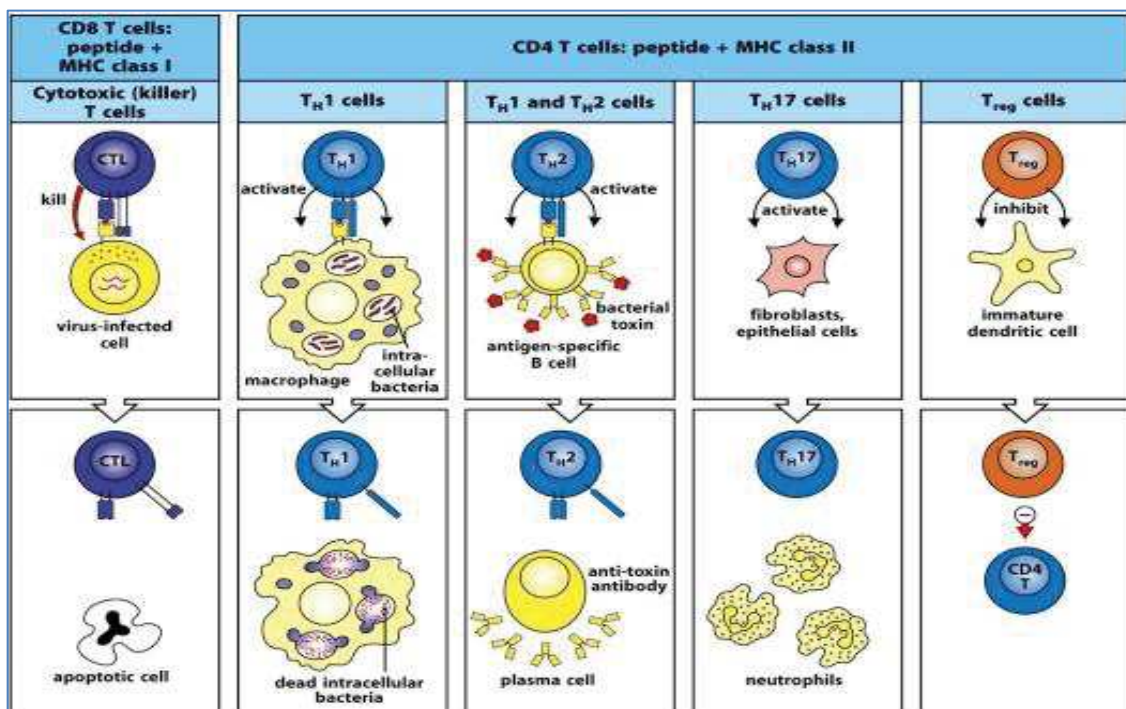


Figure 8 : Polarisation de la réponse lymphocytaire T (Murphy, K. et al. Janeway's immunobiology)

d) Les essais thérapeutiques ciblant la réponse inflammatoire excessive

Plus de 150 études cliniques ont ciblé la réponse hyperinflammatoire du choc septique avec pour objectif d'inhiber les PPR, les PAMPs, les cytokines et des médiateurs de l'inflammation (**Fig.9**). Mais aucune n'a été suffisamment efficace pour être validée en pratique clinique. L'une des explications probables à ces échecs successifs est la difficulté d'identifier les patients candidats à un traitement anti-inflammatoire précoce (Eichacker et al., 2002) et de déterminer le bon temps d'administration de ces traitements. Les anticorps anti-IL1 pourraient être bénéfiques chez les patients porteurs de choc septique sévère compliqué de syndrome lymphe-histiocytaire (Meyer et al., 2018) (Shakoory et al., 2016). Les anticorps anti-TNF α administrés à la phase précoce du sepsis pourraient avoir un bénéfice auprès de sous-population de patients les plus inflammatoires (Panacek et al., 2004) (Qiu et al., 2013). L'effet bénéfique des corticoïdes au cours du sepsis fait également débat depuis de nombreuses années, les derniers résultats d'études prospectives suggèrent leur intérêt à faible dose chez les patients les plus sévères (Annane et al., 2018).

Target	Class	Study type	Drug	Finding	Refs
Endocrine abnormalities	Corticosteroids	Meta-analysis	Corticosteroid	No or modest effect	173,174
	Vasopressors	Prospective RCT	Arginine vasopressin	No effect	175
Endotoxin	Monoclonal antibody	Prospective RCT	HA-1A	No effect	176,177
			E5	No effect	
	Lipid emulsion	Prospective RCT	GR270773	No effect	178
	Bactericidal-permeability increasing peptide	Prospective RCT	rBP121	Modest effect	179
TLR4	Monoclonal antibody	Prospective RCT	TAK-242	No effect	180,181
			Eritoran tetrasodium	No effect	
CD14	Monoclonal antibody	Prospective RCT	IC14	Unclear	182
TNF	Monoclonal antibody	Prospective RCT	BAY 1351	No effect	183,184
				No effect	
	Immunoadhesin	Prospective RCT	Lenercept	No effect	124,185
			Etanercept	No effect	
IL-1	Receptor antagonist	Prospective RCT	Anakinra	No effect	186
PAF	PAF antagonist	Prospective RCT	TCV-309	No effect	187,188
			Lexipafant	No effect	
Eicosanoids	NSAIDs	Prospective RCT	Ibuprofen	No effect	189
	Soluble phospholipase A2 inhibitor	Prospective RCT	Varespladib	No effect	190
CSa	Monoclonal antibody	Prospective RCT	CaCP29	Ongoing	49
Nitric oxide	L-N-methylarginine	Prospective RCT	546C88	Modest effect	191
	Reducing agents	Prospective RCT	Methylene blue	Modest effect	192
Hypercoagulability or disseminated intravascular coagulation	Activated protein C concentrate	Prospective RCT	Drotrecogin alfa (activated)	Beneficial	141,193
				No effect	
	Tissue factor pathway inhibitor	Prospective RCT	Tifacogin	No effect	194
	Antithrombin	Prospective RCT	Antithrombin	No effect	195
	Anti-tissue factor antibody	Prospective RCT	ALT-836	No effect	196
	Heparin	Meta-analysis	Heparin salt	Modest effect	197
	Thrombomodulin	Prospective RCT	ART-123	Modest effect	198
Others	Intravenous immunoglobulin	Meta-analysis	Intravenous immunoglobulin	No effect	123
	Selenium (antioxidant)	Prospective RCT	Selenium	No effect	199
	Bradykinin antagonists	Prospective RCT	Deltibant	No effect	200
	N-acetylcysteine	Meta-analysis	N-acetylcysteine	No effect	201,202
				No effect	
	Statins	Meta-analysis	Atorvastatin, simvastatin and roxustatin	No effect	171
	Extracorporeal haemoperfusion	Prospective RCT	Adsorber EN500	No effect	203

PAF, platelet-activating factor; RCT, randomized controlled trial; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumour necrosis factor.

Figure 9 : Essais cliniques à visée anti-inflammatoire au cours du sepsis (Angus and van der Poll, 2013)

4. La physiopathologie du sepsis : l'immunodépression post septique

a) Le concept de l'immunodépression post septique

L'équilibre entre une réponse immunitaire efficace et le respect des capacités physiologiques de l'organisme pour un individu donné est donc l'un des déterminants majeurs du pronostic précoce et tardif au cours du sepsis. L'activation excessive de la réponse inflammatoire à la phase précoce de l'invasion bactérienne peut s'accompagner de dysfonctions d'organe sévères (Netea et al., 2017) définissant le sepsis et l'état de choc septique dans sa forme la plus grave, dont la mortalité est respectivement de 10 à 40% (Singer et al., 2016). De manière concomitante à l'initiation de la réponse pro-inflammatoire, une réponse anti-inflammatoire compensatrice se met en place pour contrôler l'activation immunitaire et limiter les dommages induits par cet orage cytokinique (Hotchkiss et al., 2016). Cette réaction est appelée « CARS » pour The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome en référence au SRIS (Hotchkiss et al., 2016).

Une polarisation excessive vers une immunodépression secondaire excessive et prolongée est pourvoyeuse de surmortalité (Boomer et al., 2011). Les patients survivant à la phase précoce du sepsis présentent dès le 4^{ième} jour une susceptibilité accrue aux infections secondaires, aux infections opportunistes et aux réactivations virales (CMV, EBV, HSV) (Luyt et al., 2007) (Limaye et al., 2008) témoignant de cette immunoparalysie post septique (Hotchkiss et al., 2013a) (Venet and Monneret, 2018).

Les progrès thérapeutiques en réanimation pour la prise en charge de la phase initiale « pro-inflammatoire » du sepsis ont fait reculer la mortalité précoce. Cependant, la morbi-mortalité hospitalière plus tardive dans les suite du sepsis reste essentiellement lié aux épisodes infectieux secondaires nosocomiaux (Landelle et al., 2008). Ces derniers sont favorisés par cette immunosuppression prolongée maintenant bien établie dans la littérature (Hotchkiss et al., 2013b). Cette IS est définie comme l'association d'une dysfonction des CPA, des neutrophiles, des monocytes, ainsi qu'une lymphopénie profonde et prolongée (Boomer et al., 2012) (Williams et al., 1983) touchant notamment les sous-populations CD4, CD8, NK. La perte du répertoire immunitaire T (Venet et al., 2010a) (Venet et al., 2013a) ainsi qu'une anergie lymphocytaire caractérisée par une diminution des capacités de production lymphocytaire d'INF γ (Venet et al., 2012) sont également décrites. D'autre part, un phénomène « d'épuisement lymphocytaire » semblable à celui observé en cancérologie (expression membranaire de PD-1 et CTLA-4) (Guignat et al., 2011) (Chang et al., 2013b) (Boomer et al., 2011) est également observé (**Fig.10**). Cette immunodépression induite par l'infection est associée à un mauvais pronostic, mais également à une surmortalité globale. Elle pourrait également favoriser la survenue plus tardive d'événements cardio-vasculaires et de cancers (van Vught et al., 2016) (Stortz

et al., 2018) (Linder et al., 2014). La spécificité de ces désordres immunologiques varie en fonction de la sévérité (état hyper inflammatoire initial) et en fonction du type de pathogène responsable du sepsis (Mina et al., 2015).

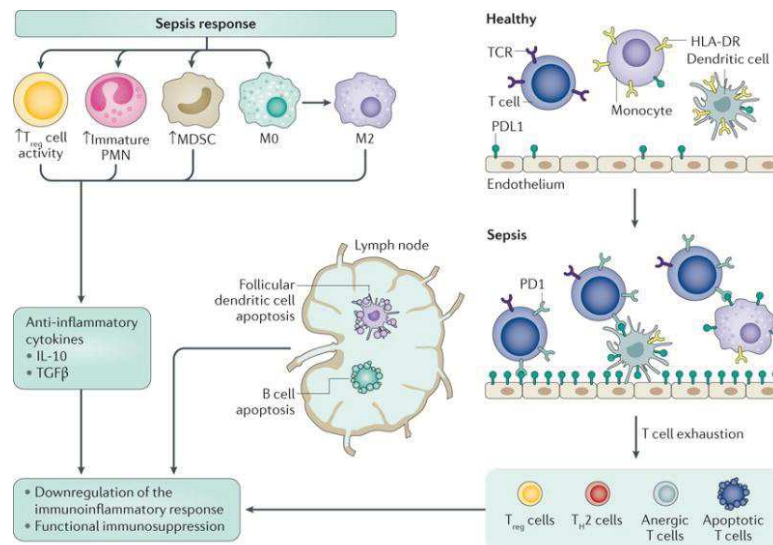


Figure 10 : Résumé des mécanismes d'immunosuppression post septique (Hotchkiss et al., 2013b)

b) Physiopathologie de l'immunodépression post septique (IS)

L'un des mécanismes majeurs de l'IS post septique est une forte induction de l'apoptose cellulaire (Hotchkiss et al., 2013b). Cette apoptose touche les cellules dendritiques, les lymphocytes T (Hotchkiss et al., 2001a), B (Unsinger et al., 2010) et Natural killer (NK). Elle est secondaire à l'activation de la voie extrinsèque (Fas/FasL) (Hotchkiss et al., 2005) (Venet et al., 2006), la voie intrinsèque et s'associe à une diminution d'activation des voies anti-apoptotiques factor B cell lymphoma 2 (Bcl-2) (Fig. 11).

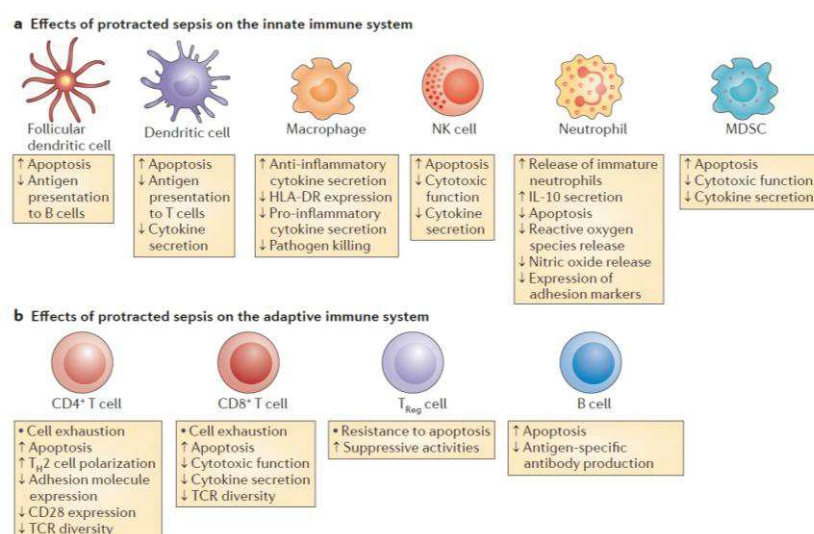


Figure 11 : Résumé des principales atteintes de l'immunité innée et adaptative au cours de l'IS post septique (Hotchkiss et al., 2013b)

c) Les atteintes de l'immunité innée

Les altérations touchant l'immunité innée et les cellules myéloïdes sont nombreuses au cours de l'IS post septique (**Fig.12**).

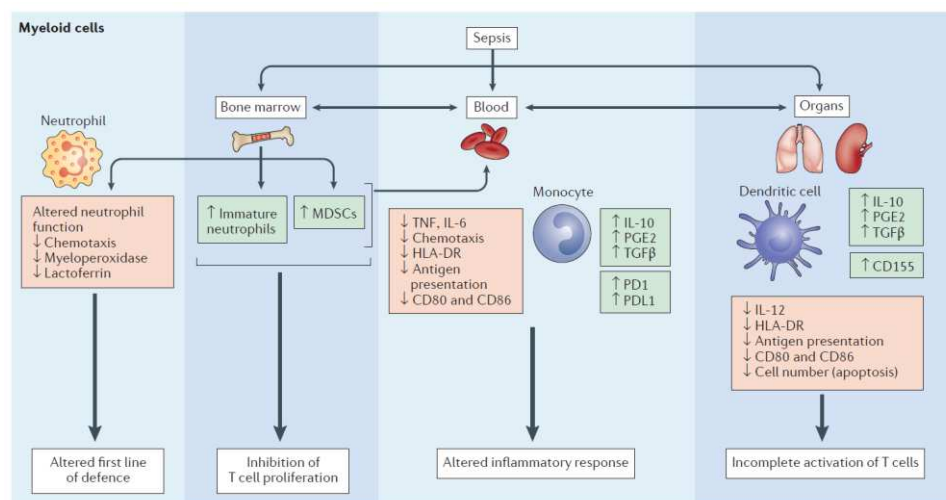


Figure 12 : Résumé des atteintes de l'immunité innée au cours de l'IS post septique (Venet and Monneret, 2018)

L'atteinte des cellules dendritiques (DC)

Le nombre et les fonctions des cellules dendritiques sont profondément altérés par le sepsis. La baisse du nombre des DC circulantes (Guisset et al., 2007) et spléniques (Hotchkiss et al., 2002) est corrélée à la sévérité du sepsis. Dans un modèle murin, l'induction d'expression de facteurs de type BCL-2 par des DC (Gautier et al., 2008) permet de limiter l'immunodépression induite par le lipopolysaccharide (LPS). Le phénotype des cellules dendritiques est également modifié (Poehlmann et al., 2009). Elle présentent au cours de l'IS post septique une baisse d'expression membranaire des molécules Human Leukocyte Antigen – DR isotype (HLA-DR) et une augmentation d'expression de l'IL-10 (Pastille et al., 2011), qui est associé à un risque accru d'infection nosocomiale (Grimaldi et al., 2011). Ces DC présentent alors un profil tolérogène (Roquilly et al., 2017) avec augmentation de l'expression du facteur de transcription B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) et perte d'expression de CD80, CD86 (Benjamim et al., 2005) et CD40. Les cellules dendritiques présentent à la fois une perte de leur fonction de cellule présentatrice d'antigène et de leur pouvoir d'activation des lymphocytes T. Elles présentent également un défaut de production d'IL-12 limitant l'activation des cellules NK. L'augmentation d'expression d'IL-10 et de TGF- β favorise en parallèle l'accumulation des Treg en situation de sepsis (Roquilly et al., 2017).

L'atteinte des monocytes et macrophages

Au cours de l'IS post septique, les monocytes et macrophages présentent une altération de leur capacité d'expression des cytokines pro-inflammatoire comme le TNF α , IL-1 β , IL-6 et IL-12, ce qui définit le phénomène de tolérance à l'endotoxine (Biswas and Lopez-Collazo, 2009). Comme observé dans les cellules dendritiques, les monocytes développent un profil tolérogène favorisant la réponse anti-inflammatoire avec l'induction d'IL1-RA et IL-10 (Cavaillon and Adib-Conquy, 2006). Cette reprogrammation (Zhang and Morrison, 1993), est associée à un risque accru d'infections secondaires en réanimation (Monneret et al., 2006). Le suivi du taux d'expression membranaire de HLA-DR monocyttaire est devenu un marqueur de référence du suivi de l'immunosuppression induite par le sepsis (Lukaszewicz et al., 2009), corrélée aux dysfonctions cellulaires (Astiz et al., 1996)(Rode et al., 1982)(Landelle et al., 2010) (Monneret et al., 2017).

L'atteinte des cellules Natural Killer (NK)

Les fonctions des cellules NK sont également fortement altérées dans les suites du sepsis (Forel et al., 2012). La diminution de leur nombre (Venet et al., 2010a) semble associée à une sur mortalité des patients au cours du sepsis. Les NK présentent également suite au sepsis une tolérance aux agonistes TLR (Chiche et al., 2012) (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012a) caractérisée par une baisse de leur capacité d'expression d'INF γ et de granzyme B (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012b). Les marqueurs d'inhibition T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3) (Hou et al., 2014), PD1 et programmed death-ligand 1 (PD-L1) (Shindo et al., 2017a) sont surexprimés par les NK en condition de sepsis. Les fonctions des NK dans l'immunité antivirale et anti-cancéreuse sont possiblement à mettre en perspective avec le risque accru de réactivation CMV, HSV et EBV observé chez les patients prise en charge dans les suites d'un choc septique.

L'atteinte des polynucléaires neutrophiles

Le sepsis s'accompagne d'une hyperleucocytose marquée, résultant d'une apoptose retardée (Tamayo et al., 2012) associée à l'augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles immatures CD10^{lo}CD16^{lo} (Drifte et al., 2013). Dans un modèle murin, les dysfonctions des neutrophiles induits par un sepsis polymicrobien sont associées à une augmentation de la susceptibilité des souris à une pneumopathie secondaire à *Pseudomonas aeruginosa* (Delano et al., 2011). Ces neutrophiles présentent par ailleurs des modifications fonctionnelles induites par le sepsis limitant leur pouvoir antibactérien. La diminution des capacités de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS)(Kovach and Standiford, 2012), la perte de leur activité de chimiotactisme par défaut d'expression de CXCR1, CXCR2, CD11b (Demaret et al., 2015), ainsi que les anomalies rapportées sur

leurs TLR (Kovach and Standiford, 2012) pourraient participer à l'IS post septique (Stephan et al., 2002).

Les neutrophiles sont composés de populations hétérogènes, dont les D16^{hi} CD62L^{lo} induits par l'INF γ , capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T via l'expression de PD-L1 (Langereis et al., 2017) (de Kleijn et al., 2013), ainsi que les CD14^{lo}CD24^{hi}CD16^{lo} cytotoxiques en co-culture pour les lymphocytes T activés (Guérin et al., 2014). D'autres populations de neutrophiles sont capables de produire de l'IL10 au cours du sepsis et favoriser cette IS (Kasten et al., 2010a).

d) Les atteintes de l'immunité adaptative

L'IS post septique est également caractérisée par des atteintes de l'immunité adaptatives touchant les lymphocytes T, lymphocytes B (Fig.13).

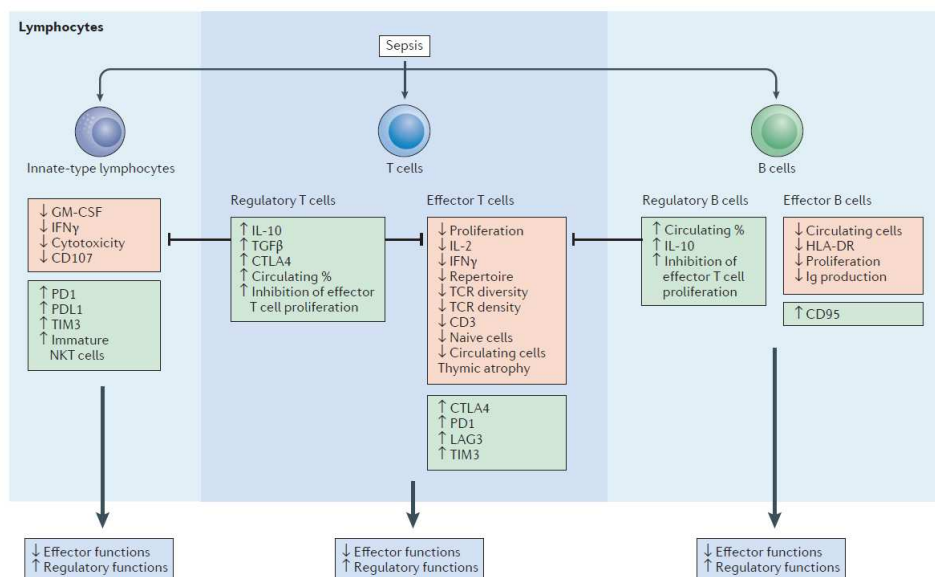


Figure 13 : Les atteintes de l'immunité adaptative au cours de l'IS post septique (Venet and Monneret, 2018)

L'atteinte lymphocytaire T CD4+

Les études autopsiques de patients décédés de choc septique rapportent une lymphopénie globale profonde (Boomer et al., 2011)(Le Tulzo et al., 2002). La profondeur et la durée de cette lymphopénie, comme chez le patient VIH, est prédictive du risque d'infections secondaires (Drewry et al., 2014) (Stortz et al., 2018). Plusieurs mécanismes sont associés, dont une anergie, une perte du répertoire lymphocytaire T (Venet et al., 2013a) et un phénomène d'épuisement lymphocytaire (Hotchkiss et al., 2013b).

« **T cell exhaustion** » : Au cours de l'IS post septique, il est rapporté un phénomène d'épuisement lymphocytaire, également appelé « T cell exhaustion » initialement, décrit dans les pathologies

cancéreuses (Wherry, 2011) et virales chronique (Zajac et al., 1998). Cet épuisement lymphocytaire est secondaire à l'activation prolongée des lymphocytes T par leur antigène apparenté. Il est caractérisé par (1) une diminution d'expression d'INF γ et TNF α des lymphocytes T stimulés, (2) une diminution d'expression lymphocytaire T de CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL-7), (3) une augmentation d'expression de PD1 sur les T CD4 $^{+}$ associé à une baisse des capacités de prolifération lymphocytaire T. Il est également décrit une expression de PD-L1 par les macrophages. Cet épuisement lymphocytaire est associée à une augmentation du risque d'infection nosocomiale (Guignat et al., 2011). Dans des modèles murins de sepsis, l'inhibition de l'axe PD1/PD-L1 améliore la survie (Huang et al., 2009) (Brahmamdam et al., 2010) (Zhang et al., 2010) et elle diminue également la sévérité d'une pneumonie à *S.aureus* dans un modèle murin d'immunodépression induite par une section médullaire (Ruggeri et al., 2019).

D'autres marqueurs d'épuisement lymphocytaire ont également été rapportés au cours du sepsis, comme l'augmentation d'expression par les lymphocytes T conventionnels de CTLA-4, Tim-3, BTLA (B and T lymphocyte attenuator), Lag-3 (Lymphocyte activation gene-3) (Venet and Monneret, 2018).

La polarisation de la réponse lymphocytaire T CD4 au cours du sepsis

Au décours de la phase aiguë du sepsis, les cytokines de la voie Th1, le TNF α et l'INF γ (Venet et al., 2004) (De et al., 2000) (Wick et al., 2000) ainsi que le facteur de transcription T-bet sont inhibés. L'IL-4 et le facteur de transcription GATA3, plus spécifiques de la voie Th2, sont également sous exprimés (Pachot et al., 2005). Ces altérations des fonctions Th1 et Th2 sont secondaires à des modifications épigénétiques touchant les promoteurs des gènes INF γ et GATA3 (Carson et al., 2010).

La voie Th17 peut également être inhibée au décours du sepsis, ce qui est associée à la baisse de l'expression du facteur de transcription ROR γ T (Pachot et al., 2005). L'atteinte de la voie Th17 et la diminution d'expression d'IL-22 et IL-17 (Romani, 2011) peuvent favoriser les infections secondaires à bactéries extracellulaires et à des agents fongiques (Benjamim et al., 2005) (Unsinger et al., 2012).

Ainsi, l'analyse des profils cytokiniques associée à la celle des ARN messagers des facteurs de transcription des patients présentant une IS post septique, suggèrent une diminution globale de l'expression de T-bet, GATA3 et ROR γ T dans le sang (Venet et al., 2010a), associé au maintien de l'expression du facteur de transcription FoxP3 en faveur d'une perte des fonction lymphocytaire Th1, Th2, Th17 associées à une activation des lymphocytes Treg.

Dans une cohorte de patients pris en charge pour une bactériémie à *Staphylococcus aureus* l'augmentation du ratio Th17/Treg, est rapporté comme associé à une évolution clinique défavorable

chez les patients immunocompétents, alors que la baisse du ratio Th1/Treg était associée à une surmortalité chez les patients immunodéprimés (Greenberg et al., 2018) (Gupta et al., 2016). Dans d'autres travaux, l'orientation prédominant vers la voie Th2 au cours du sepsis est associée à des mécanismes d'échappements immunitaires de mauvais pronostic (Roth et al., 2003a) (Li et al., 2015). La variabilité des patients ainsi que celle des méthodes d'analyse employées dans ces études complexifient l'interprétation globale de ces résultats. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une meilleure caractérisation du statut immunitaire des patients pourrait permettre de mieux les stratifier au cours du sepsis et permettre le développement de traitements immunomodulateurs personnalisés.

L'atteinte des lymphocytes CD8

Les lymphocytes T CD8⁺ sont des acteurs importants de la défense contre les pathogènes intracellulaires, par les agents cytotoxiques (granzyme B et perforine) ainsi que l'INF γ qu'ils produisent (Hotchkiss et al., 2013b). L'apoptose et l'épuisement lymphocytaire induits par le sepsis impliquent également les lymphocytes T CD8. La dysfonction lymphocytaire CD4 (Condotta et al., 2013) associée à celle des cellules présentatrices d'antigène par la baisse d'expression de HLA-DR, renforce l'altération des fonctions des lymphocytes CD8. L'épuisement lymphocytaire CD8 est caractérisé par l'expression de CTLA-4, PD1, Lag-3 ainsi qu'une baisse de production d'INF γ , TNF α , de granzyme B et CD107a (Condotta et al., 2015).

L'atteinte des lymphocytes B

Le lymphocyte B joue un rôle majeur au cours de la réponse pro-inflammatoire du sepsis (Mohr et al., 2012). Les innate response activator (IRA) lymphocytes B et leur sous-type produisant l'IL-3 induits par le sepsis sont des inducteurs de la myélopoïèse qui potentialisent la phase pro-inflammatoire initiale du sepsis (Weber et al., 2015). Le phénotype et les fonctions des lymphocytes B durant la phase d'IS post septique sont moins étudiés, certaines sous-populations lymphocytaires B sont décrites comme immunomodulatrices (Mauri and Menon, 2017). Les cellules B mémoires sont particulièrement sujettes à l'apoptose (Shankar-Hari et al., 2017). Il est également décrit une altération de la capacité d'expression d'IgM (Giamarellos-Bourboulis et al., 2013). La baisse d'expression membranaire de HLA-DR et d'autres marqueurs de maturation suggèrent l'existence d'un profil d'épuisement lymphocytaire B (Venet and Monneret, 2018) (Gustave et al., 2018). Les plasmocytes réactionnelles au sepsis semblent participer à cette IS post septique (Gosse et al., 2018).

e) L'activation des Lymphocytes Treg

Alors que le sepsis s'accompagne d'une lymphopénie T CD4+ profonde au cours de l'IS post septique, les lymphocytes Treg en condition inflammatoire résistent à l'apoptose, expliquant leur persistance et l'augmentation précoce du ratio Treg/CD4+ (Gouel-Chéron et al., 2012). L'augmentation de ce ratio ainsi que les modifications phénotypiques des Treg suggèrent leur activation au cours de l'IS (Monneret et al., 2003) (Venet et al., 2004) (Saito et al., 2008) (Hein et al., 2010) (Tatura et al., 2012). Cependant, les définitions phénotypiques des Treg chez l'homme sont très hétérogènes et reflètent les difficultés à définir précisément cette population.

CD25 est un marqueur ni spécifique ni sensible de l'ensemble de la population Treg. Parmi les lymphocytes T CD4+ près de 25% expriment CD25 et seul 1 à 2 % de ceux exprimant fortement CD25 ont une activité suppressive. De plus, une partie des lymphocytes T CD4+FoxP3+ n'exprime pas le CD25 et certains lymphocytes T effecteurs activés expriment le CD25 sans avoir de pouvoir inhibiteur (Baecher-Allan et al., 2001a) (Baecher-Allan et al., 2001a) (Seddiki et al., 2006a). La définition des Treg à partir de la co-expression membranaire de CD4+CD25+ en contexte de sepsis est donc imparfaite et probablement fautive si on considère leurs fonctions suppressives.

L'utilisation du marqueur membranaire CD127 (la chaîne α du récepteur à l'IL-7) pour phénotyper les Treg permet de gagner en spécificité. Cependant, parmi les lymphocytes CD4+CD127-, seuls 40% expriment Foxp3+, les lymphocytes CD4+CD127- comprenant des lymphocytes sans fonction suppressives (Shevach, 2006a).

Le facteur de transcription FoxP3 est un marqueur majeur de la population Treg. Cependant la co-expression CD4+ FoxP3+ chez l'homme n'est également pas assez spécifique pour définir à elle seule la population Treg en condition de sepsis. En effet, l'expression de FoxP3 est décrite chez l'homme par une population, les T effecteurs activés, sans pouvoir inhibiteur (Allan et al., 2007a). L'analyse de FoxP3 en cytométrie en flux nécessite la fixation et la perméabilisation cellulaire pour permettre le marquage intranucléaire. Il ne permet donc pas de travailler sur des cellules viables afin d'évaluer leurs fonctions. Ceci explique en partie les différentes stratégies de « gating » des lymphocytes T reg en fonction des contraintes expérimentales et du contexte clinique (**Tabl. 1**).

Une définition consensuelle des Treg fonctionnels en termes de phénotype est de considérer les marqueurs T CD4+CD25+CD127-FoxP3+. D'autres marqueurs fonctionnels permettent également d'identifier les sous populations de Treg et leurs états d'activation (Vaeth et al., 2019). On distingue les Treg naïfs CD62L^{hi}CD44^{lo}, les Treg effecteurs CD62L^{lo}CD44^{hi}, puis parmi ceux-ci les Treg résidant, les Treg mémoire et les Treg folliculaires (Tfr) (Vaeth et al., 2019).

Etude	Pathologie étudiée	Délais du prélèvement	Définition phénotypique des Treg	Résultats
Monneret et al. 2003	Choc septique vs HD	Dans les 10 jours	CD4+CD25+	Pourcentage de Treg augmenté au maximum à J5
Venet et al. 2004	Choc septique vs HD	J1-2, J3-6	CD4+ CD25+	Pourcentage de Treg sepsis augmenté dès J1 et lié à baisse de CD4+ CD25-
Saito et al. 2008	Sepsis (non grave) vs SIRS vs HD (jeune + âgé)	J1 admission ICU	CD4+ CD25+	Pourcentage de Treg sepsis augmenté et de CD25 soluble
Venet et al. 2009	Choc septique et HD	J3-7	CD4+ CD25+ CD127-	Pourcentage de Treg sepsis augmenté et associé à moindre prolifération lymphocytaire
Hein et al. 2010	Choc septique vs. Choc autre vs. HD	J1 (<12h), J3, J5, J7	CD4+CD25+ CD127-	Pourcentage de Treg sepsis augmenté à partir de J5, pas de différence nb absolu et pourcentage Treg sepsis corrélé à mortalité
Tatura et al. 2012	Sepsis sévère ou choc septique	< 48h admission	CD4+ CD25hi CD127lo	Pourcentage Treg sepsis augmenté
Chen et al. 2015	Sepsis (dont chocs) vs HD	J1 J7	CD4+ CD25+	Pourcentage Treg augmenté à J7 et corrélé à la mortalité

Tableau 1 : Définitions des Treg au cours du sepsis

Pour exercer leur pouvoir supprimeur, les Treg doivent être activés et en nombre suffisant. Le ratio de Treg sur nombre de lymphocyte T effecteurs est donc un indicateur pertinent de leur pouvoir supprimeur (Venet et al., 2008). Le ratio Treg/T CD4 d'efficacité maximale est estimé à 1 lymphocyte Treg pour 9 lymphocytes effecteurs au cours d'expériences de co-transfert de Treg spécifiques dans des modèle murin de diabète auto-immun (Tang et al., 2004). Le pourcentage de Treg parmi les T effecteurs circulants augmente précocement chez les patients les plus sévères au cours du sepsis.

Les Treg présentent au cours du sepsis une résistance à l'apoptose par la surexpression de facteurs anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (Chung et al., 2011). L'expansion des Treg est associée à un mauvais pronostic au cours du sepsis et à une baisse de la profération des lymphocytes T (Venet et al., 2009). L'inactivation de FoxP3 par des siRNA restaure l'activité des T effecteurs, ainsi que l'inhibition de GITR (TNFRSF18) (Scumpia et al., 2007). Cette IS induite par le Treg activés par le sepsis perdure dans le temps et pourrait favoriser le développement de cancer secondaire (Cavassani et al., 2010).

f) Le PICS « persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome »

Parmi les patients survivants à la phase initiale du sepsis mais nécessitant la poursuite des soins dans les services de réanimation pour des défaillances d'organes persistantes, il est observé un état associant une réponse pro-inflammatoire persistante associé à des signes d'IS post septique, définissant le « **persistent inflammation/immunosuppression and catabolism syndrome** » (Horiguchi et al., 2018)(PICS). Le PICS est caractérisé par une inflammation persistante avec hyperleucocytose, un dosage de CRP élevé, secondaire au relargage de DAMPs et alarmins (protéines S100A8, S100A9, HMGB1) entretenu par la souffrance d'organes. Associée à ce syndrome inflammatoire coexiste une immunodépression paradoxale impliquant les MDSC (Mathias et al., 2017), les lymphocytes Treg (Mira et al., 2017). L'absence de restauration de l'expression de HLA-DR (Zorio et al., 2017), la persistance d'un haut niveau d'IL-6 sont également attaché à ce syndrome (Yende et al., 2016).

L'inflammation incontrôlée s'accompagne d'un hypercatabolisme et d'une dénutrition proche de celle retrouvée dans d'autres contextes cliniques, comme les néoplasies et les infections chroniques (Nomellini et al., 2018).

L'IS post septique et le PICS sont proches des caractéristiques de l'immunosénescence, avec une perte de différenciation des progéniteurs myéloïdes, une lymphopénie, une perte du répertoire lymphocytaire T (Oliveira et al., 2017) (Nguyen et al., 2017). Les patients survivant au sepsis pourraient être ainsi considérés comme sujet à une immunosénescence accélérée.

5. Les marqueurs diagnostiques de l'IS post septique

Le sepsis est donc un processus dynamique associant une balance pro et anti-inflammatoire qui implique simultanément l'immunité innée et adaptative à l'échelle locale et systémique. Le statut immunitaire et le type de réponse immunitaire de l'hôte est évolutif dans le temps et dépend du type de pathogènes et de la rapidité de prise en charge thérapeutique (**Fig.14**).

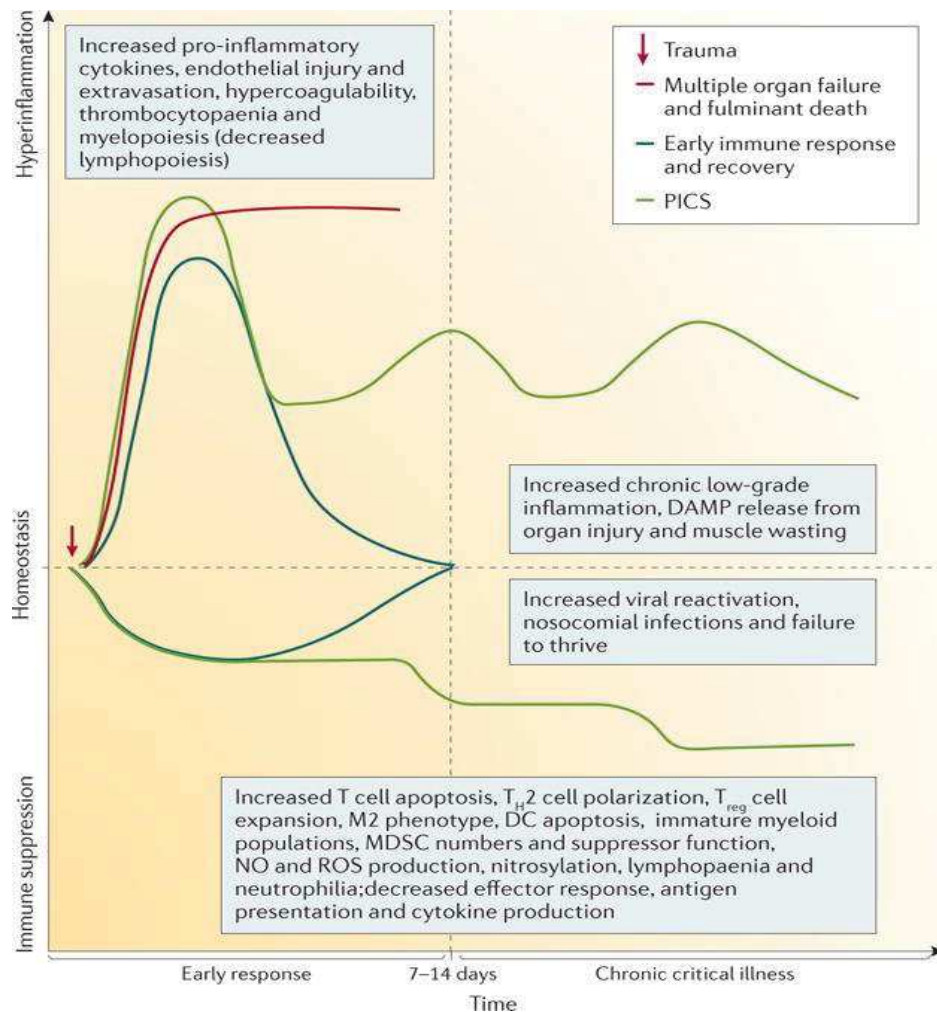


Figure 14 : Concepts de profils de réponses au sepsis (Hotchkiss et al., 2016)

L'identification par des biomarqueurs du statut immunitaire des patients au cours du sepsis est donc un enjeu majeur pour le développement de thérapies immunostimulantes. Ces biomarqueurs pourraient permettre des progrès majeurs dans le traitement personnalisé du sepsis.

a) Les biomarqueurs de l'IS post-septique

On retrouve parmi les marqueurs diagnostiques les plus étudiés :

Des biomarqueurs spécifiques de l'immunité innée :

- La baisse d'expression de HLA-DR monocytaire. La baisse de CD88, le récepteur au C5a impliqué dans l'activation des neutrophiles (Furebring et al., 2002), à la surface des neutrophiles, permet le diagnostic et le suivi de l'IS post-septique (Landelle et al., 2010). Ils sont utilisés pour le diagnostic de l'IS (Venet et al., 2013b) (Meisel et al., 2009) et servent de critères d'inclusions dans des études cliniques évaluant l'impact du GM-CSF et de l'INF γ , (Rol et al., 2017). La baisse d'expression du CD88 des neutrophiles est décrit comme un marqueur de dysfonction immunitaire associé aux risque d'infection secondaire (Conway Morris et al., 2018)
- La baisse des capacités de production de TNF α par les PBMC stimulé par du LPS. Il s'agit d'un test fonctionnel permettant d'évaluer la réactivité des monocytes (Monneret et al., 2017)
- L'augmentation d'expression de PD-L1 par les monocytes circulants (Gossez et al., 2018) est associée à la mortalité à J28 du sepsis (Tai et al., 2018)
- L'augmentation du taux circulant d'IL-10/TNF α est en faveur d'une polarisation Th2 de la réponse immunitaire (Hotchkiss et al., 2016).

Mais également, des marqueurs de de l'immunité adaptative :

- La lymphopénie profonde et persistante après le troisième jours du sepsis est un marqueur robuste et simple de l'IS (Stortz et al., 2018) (Drewry et al., 2014).
- Les réactivations CMV, HSV, EBV et le diagnostic d'infections opportunistes témoignent directement du déficit immunitaire (Hotchkiss et al., 2013b).
- L'augmentation d'expression de PD1 sur les lymphocytes T et lymphocytes B (Wilson et al., 2018).
- L'augmentation du ratio Treg/TCD4 circulants (Conway Morris et al., 2018).
- La baisse d'expression de CD127 sur les lymphocytes CD4 est un marqueur de « T cell exhaustion » (Wherry, 2011).
- La baisse de capacité de production INF γ , IL-2, TNF α par les lymphocytes T stimulés in vitro (Letessier et al., 2018).
- La baisse du taux de prolifération des lymphocytes T après stimulation ex vivo (Venet et al., 2012).

b) Les nouveaux outils de typage moléculaire à haut débit

Le développement technologique et la diffusion de nouveaux outils d'analyse à haut débit permet d'envisager de nouvelles stratégies diagnostiques pour la détection des dysfonctions immunitaires au cours du sepsis (**Fig.15**).

Les analyses transcriptomiques permettent l'analyse simultanée de l'expression de milliers de gènes, définissant des signatures d'expression génétique aussi appelé « endotype » (Lelgudowicz and Matthay, 2019). L'analyse des profils transcriptomiques des leucocytes de large cohorte de patients à la phase précoce du sepsis permet de définir les profils de réponse immunitaires et leurs impacts pronostiques (Wong et al., 2009) ; trois principaux endotypes sont identifiés dans ce travail. L'endotype le plus associé à la mortalité et à la sévérité comprend des associations de gènes impliquées dans la répression du système immunitaire adaptatif, des glucocorticoïdes et de l'homéostasie du zinc.

Le même type d'étude a été réalisé sur une population d'adulte pris en charge pour des pneumopathies communautaires. Le profil transcriptomique associé à une surmortalité à 2 semaines du sepsis était associé à l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes l'immunosuppression, la tolérance à l'endotoxine, l'épuisement lymphocytaire T, la baisse d'expression de HLA de classe II et des voies métaboliques de la glycolyse (Davenport et al., 2016).

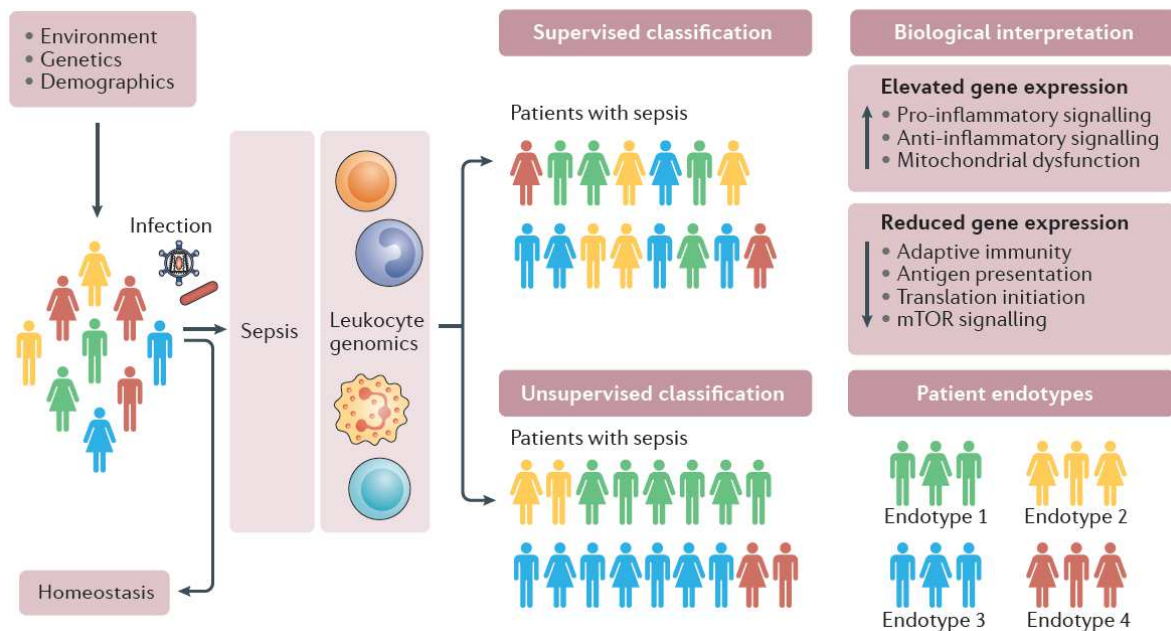


Figure 15 : Théorie du classement par endotype du sepsis (van der Poll et al., 2017)

Le même type d'approche a été évalué chez des patients pris en charge pour des péritonites (Burnham et al., 2017). Les résultats de ce travail sont proches de celui sur les pneumopathies, les groupes de gènes différentiellement exprimés associés au plus mauvais pronostic sont également ceux impliqués dans la tolérance à l'endotoxine, l'activation lymphocytaire T et l'apoptose.

Une étude réalisée aux Pays Bas dans le cadre du « molecular diagnosis and risk stratification of sepsis project » (MARS consortium), a évalué cette stratégie auprès de 306 patients. L'endotype associé au plus mauvais pronostic était celui dominé par une diminution d'expression des gènes impliqués dans les fonctions de l'immunité innée et adaptative (TLR, NF- κ B), la présentation antigénique, les signaux des récepteur lymphocytaire T. Ce profil rappelle les mécanismes impliqués dans l'épuisement immunitaire déjà décrit par d'autres. L'endotype associé au meilleur pronostic était quant à lui lié à une activation des voies de signalisation des lymphocytes T helper, NK, et B et de la signalisation de la voie IL 4. L'analyse des données de plus de 700 patients (Sweeney et al., 2018) conclue également sur le rôle délétère de l'activation de la réponse immunitaire innée associé à une immunodépression touchant le compartiment adaptatif.

Ces nouvelles approches nécessitent encore des ajustements. Ces analyses sont réalisées sur l'ensemble des PBMC (peripheral blood mononuclear cell), il est donc possible que les variations majeures d'endotype puissent refléter essentiellement les variations de taux des cellules dans les échantillons. Ces analyses pourraient gagner en spécificité et en reproductibilité en travaillant à partir de sous population d'intérêt parmi les PBMC, comme les sous populations lymphocytaires T (Palmer et al., 2006). Les difficultés techniques et le coût financier de ce type d'approche restent encore un obstacle à leur généralisation.

L'utilisation combiné des profils transcriptomiques et protéiques plasmatiques est également étudiée au cours du sepsis (Wong et al., 2012). Les biomarqueurs identifiés témoignent d'une dysfonction de la réponse inflammatoire et cellulaire, ainsi que l'altération des voies de signalisation des gènes répresseurs de tumeur (TP53, p53).

Les signatures protéomiques et métaboliques sont également à l'étude au cours du sepsis.

L'objectif global de ces travaux est de mieux catégoriser les patients et pouvoir proposer des traitements en fonction de leur « endotype » et ainsi développer des thérapies personnalisées (**Fig. 16**).

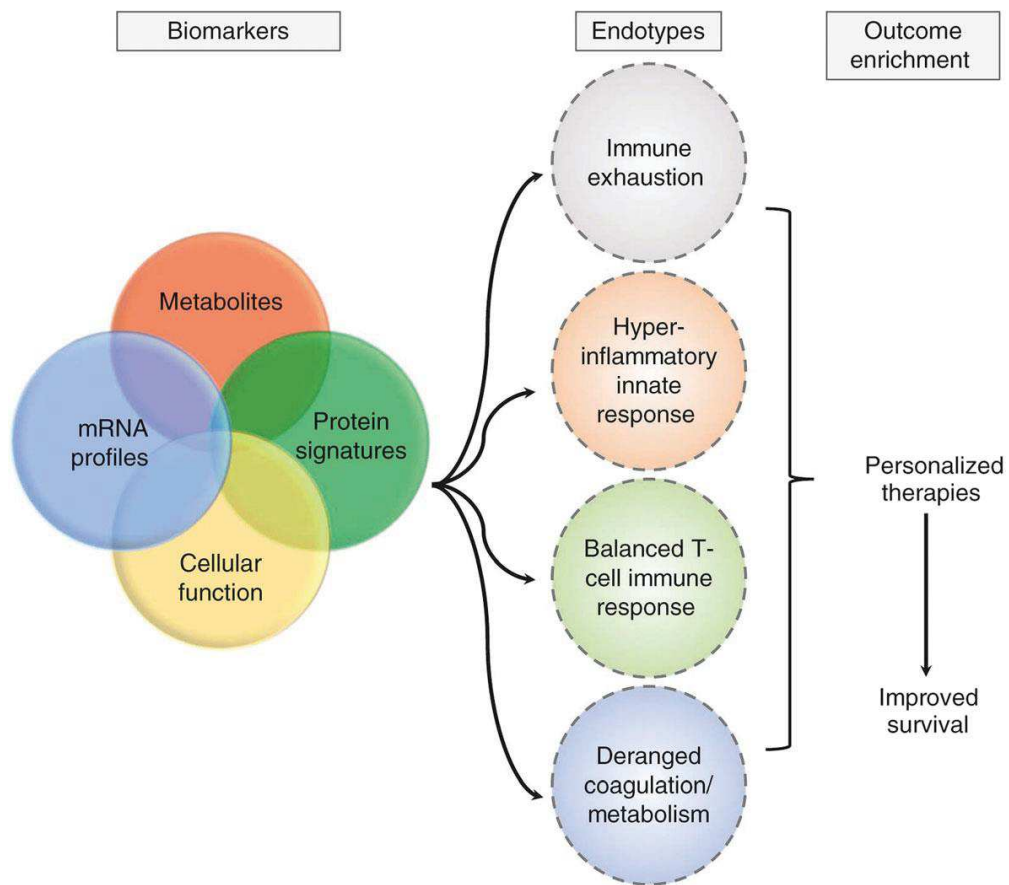


Figure 16 : Les nouvelles stratégies de classifications du sepsis à l'aide des nouveaux outils d'analyse haut débit (Leligdowicz and Matthay, 2019)

6. Les essais thérapeutiques

Les principales molécules et voies d'immuno- stimulation étudiées sont présentées dans le **tableau.2** suivants :

Agent	Function	Findings	Refs
GM-CSF	- Increases myelopoiesis - Activates monocytic or macrophage population-producing inflammatory cytokines and adhesion molecules - Increases HLA-DR expression on antigen-presenting cells - Increases neutrophil phagocytosis and killing in combination with IFNγ	- Decreased the number of patient ICU days - Decreased the APACHE II score* - Trend towards improved survival	147, 204–206
G-CSF	- Increases myelopoiesis - Increases neutrophilia	Failed to improve outcome	207, 208
IFN γ	- Increases monocyte expression of inflammatory cytokines - Increases HLA-DR expression and antigen presentation - Increases macrophage and neutrophil bactericidal activity	- Reversed immunoparalysis - Decreased mechanical ventilation time	205, 209, 210
IL-7	- Induces T cell survival and proliferation - Protects from apoptosis - Recovers from T cell exhaustion* - Increases T cell activation and adhesion molecule expression - Increases IL-17-dependent neutrophil recruitment	- Well tolerated - Reversed key immunological defects in patients with sepsis	146, 211, 212
IL-15	- Improves the development, function and homeostasis of memory CD8$^+$ T cells, NK cells, NKT cells and intestinal epithelial cells - Induces the rapid proliferation of memory and naive CD8$^+$ T cells and CD4$^+$ T cells - Increases the production of pro-inflammatory cytokines when combined with IL-12 - Increases dendritic cell activation	- Still in phase I trials - Preclinical trials have shown proliferation of NK cells, T cells and B cells, and resistance to T$_{reg}$ cell suppression - Some dose-limiting toxicity at 3 mg per kg of body weight	146, 213–215
Thymosin- α 1	- Increases CD4$^+$ T cell and NK cell numbers - Augments T cell function - Increases HLA-DR expression on antigen-presenting cells - Enhances antiviral activity	Trend towards improved survival	151, 216
PDL1-specific antibody	- Releases checkpoint inhibition - Prevents T cell exhaustion or T cell anergy - Reduces T cell apoptosis - Modulates myeloid cell interactions with the endothelium - Potentially alters macrophage and neutrophil antimicrobial functions	- Improved survival in animal models of sepsis - Breakthrough status in several malignancies, including melanoma, squamous cell carcinoma, non-small-cell lung cancer and renal cell carcinoma	217–219
CTLA4-specific antibody	- Suppresses T$_{reg}$ cell expansion - Reduces T cell apoptosis - Releases checkpoint inhibition - Prevents T cell exhaustion or T cell anergy	CTLA4-specific antibodies improved outcome to polymicrobial and fungal sepsis in rodent models	217, 220
TIM3-specific antibody	- Upregulates CD80 and CD86 expression on macrophages - Downregulates inflammatory cytokine production - Polarizes T cells towards a T$_{H$1 response - Blocks lymphocyte apoptosis	TIM3 overexpression reduced the severity of rodent sepsis, whereas blocking TIM3 exacerbated inflammation	221, 222
LAG3-specific antibody	- Prevents T cell exhaustion - Promotes T$_{reg}$ cell expansion - Increases plasma dendritic cell activation	- LAG3 cell-surface expression is increased in sepsis - Has not been tested in rodent models of sepsis	223, 224

CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HLA-DR, human leukocyte antigen-antigen D related; ICU, intensive care unit; IFN γ , interferon- γ ; LAG3, lymphocyte activating gene 3; NK cell, natural killer cell; NKT cell, natural killer T cell; PDL1, programmed death ligand 1; T $_{H$ 1, T helper 1; TIM3, T cell immunoglobulin and mucin-containing protein 3; T $_{reg}$ cell, regulatory T cell.
 *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score is a severity-of-disease classification system.

Tableau 2: Agents thérapeutiques à l'étude pour le traitement de l'IS post-septique (Hotchkiss et al., 2016)

Les molécules candidates qui ont pu passer au stade d'essai clinique chez l'homme sont les suivantes :

- Le GM-CSF et le G-CSF.
- INF γ et IL-7.
- Les inhibiteurs de PD1-PD-L1.

a) Les facteurs de croissance et stimulation du système immunitaire innée :

GM-CSF, G-CSF

Le G-CSF (facteur de croissance granulocytaire) (Root et al., 2003) (Nelson et al., 1998) et le GM-CSF (facteur de croissance granulocytaire et macrophagique) (Stephens et al., 2008) ont été évalués en traitement adjuvant du sepsis. Ils ont démontré leur efficacité dans l'induction de la myélopoïèse et l'augmentation du taux de neutrophiles, sans bénéfice clinique sur la mortalité (la population ciblée était des patients à la phase précoce du sepsis).

La première étude évaluant l'administration de GM-CSF à des patients en phase d'IS post septique sélectionnés par une diminution significative de leur expression de HLA-DR monocyttaire, a retrouvé une diminution de la durée de ventilation mécanique et de la durée de séjour en unité de soins intensifs (USI), ainsi qu'une restauration du niveau d'expression de HLA-DR (Meisel et al., 2009).

Il a également été démontré que le GM-CSF permet de restaurer les capacités de production du TNF α par les leucocytes au cours du sepsis et de diminuer l'incidence d'infections secondaires en population pédiatrique (Hall et al., 2011). Une étude lyonnaise (GRID) prospective évaluant l'efficacité du G-CSF en prévention des infections secondaires s'est terminée récemment (ClinicalTrials.gov.Identifier: NCT02361528), les résultats devraient permettre de préciser l'intérêt du G-CSF chez les patients septiques immunodéprimés.

b) Les facteurs de croissance et stimulation du système immunitaire innée :

INF γ et IL-7

L'objectif de cette approche est de stimuler les capacités de phagocytose des cellules immunitaires au cours de l'IS.

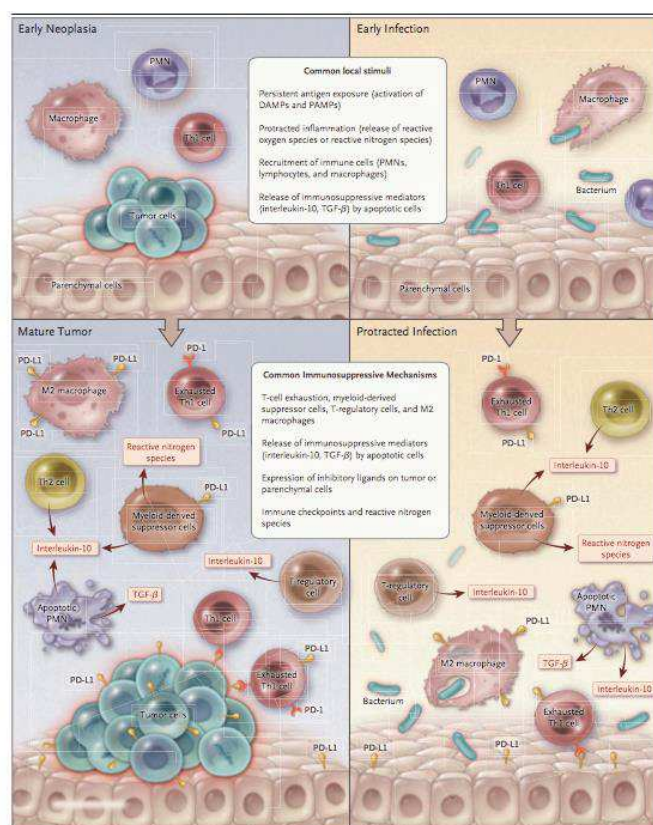
L'INF γ induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de HLA-DR par les monocytes circulants et stimule la bactéricidie des neutrophiles et des macrophages. Son utilisation au cours de l'IS permet d'inhiber l'expression des marqueurs d'immunodépression monocyttaire (Dries, 1996) (Dries et al., 1994). Son utilisation a été rapportée dans des cas report d'infections bactériennes (Nalos et al., 2012) ou fongiques réfractaires (Delsing et al., 2014). Sa sécurité d'emploi et son utilisation sont en cours d'évaluation au cours du sepsis (ClinicalTrials.gov : NCT01649921 ClinicalTrials.gov : NCT03332225)

L'IL-7 par son activité sur ses récepteurs le CD127 et CD132, favorise la survie et la prolifération des lymphocytes T, en activant l'expression des protéines de la voie anti-apoptotique BCL-2. Cette dernière permet le recrutement des neutrophiles IL17-dépendants et contribue à restaurer les fonctions

lymphocytaires par la diminution d'expression de PD1 (Kasten et al., 2010b). Dans des modèles murins de sepsis, l'IL-7 a démontré son effet protecteur (Unsinger et al., 2012). Dans des travaux ex vivo, l'IL-7 induit la prolifération et l'expression d'INF γ des lymphocytes T de patients pris en charge pour un sepsis (Venet et al., 2012). Son utilisation dans la première étude clinique de phase II, a permis d'observer une bonne tolérance avec peu de symptômes de relargage cytokinique. Cette étude retenait comme critère d'inclusion une lymphopénie < 900/mm³ au décours du diagnostic de sepsis. L'IL-7 permettait de restaurer les lymphopénies CD4 et CD8 induites par le sepsis (Francois et al., 2018).

c) Le blocage des signaux de costimulation négatifs : PD1-PD-L1

La stratégie est d'inhiber le co-signal inhibiteur aussi appelé « check point inhibiteur ». Ces stratégies thérapeutiques sont en plein essor en oncologie (Forde et al., 2018) et en hématologie (Melani et al., 2017), et porteurs de résultats très prometteurs. Les patients pris en charge pour des tumeurs évolutives présentent une immunodépression induite par le cancer proche de celle décrite dans le sepsis (Hotchkiss and Moldawer, 2014) (**Fig.17**).



N. ENGEL MED 37104 NQJM.ORG JULY 24, 2014

381

Figure 17 : Analogie entre l'échappement immunitaire au cours du cancer et du sepsis (Hotchkiss and Moldawer, 2014)

Dans des modèles murins, les anti PD-1 permettent de restaurer des fonctions lymphocytaires altérées par le sepsis (Chang et al., 2013b) ou par un traumatisme médullaire (Ruggeri et al., 2019). La première étude clinique humaine évaluant la tolérance des anticorps monoclonaux anti-PDL1 au cours du sepsis a inclut 24 patients porteurs de sepsis avec défaillance d'organe et une lymphopénie <1.100 cells/ μ L. Les effets indésirables potentiellement liés au traitement ont été observés chez 54% des patients, mais aucun d'entre eux n'a été considéré comme sévère ou ayant nécessité un traitement par corticothérapie. Chez les patients recevant la plus forte posologie d'anti-PD-L1, il a été observé une augmentation de l'expression de HLA-DR monocytaire.(Hotchkiss et al., 2019)

d) Les dangers des inhibiteurs de check point immunitaire

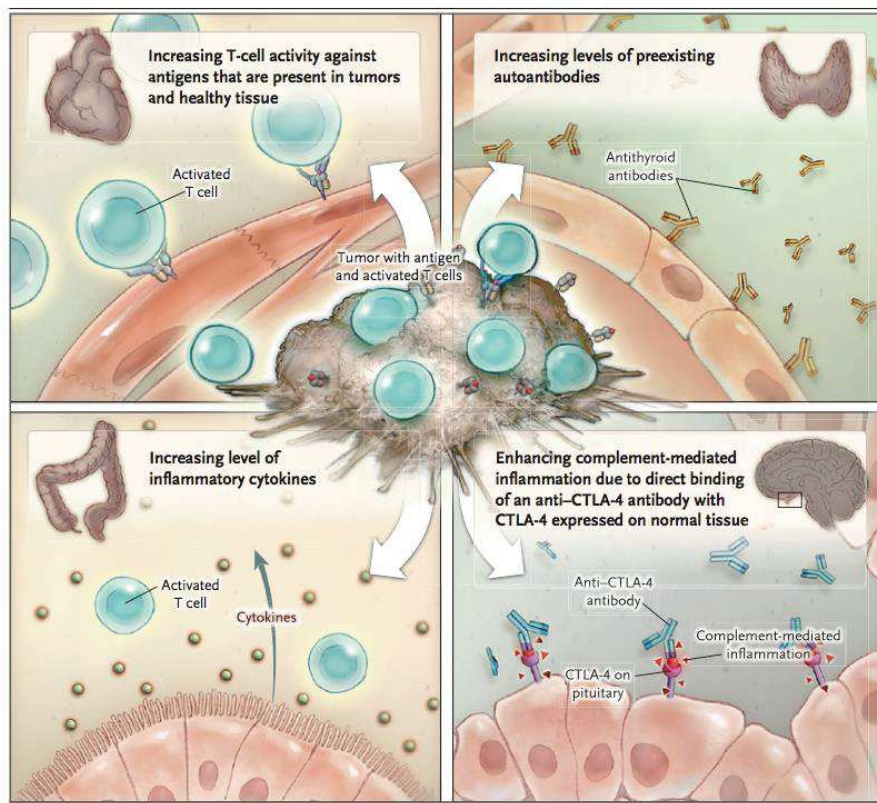


Figure 18 : Les principaux effets indésirables et mécanismes d'action des biothérapies ciblant les check point immunitaires (Postow et al., 2018)

Les inhibiteurs de check point sont couramment utilisés en oncologie médicale. L'Ipilimumab est un anti-CTLA4 monoclonal utilisé dans le mélanome. Le Nivolumab et Pembrolizumab sont des anticorps monoclonaux anti-PD1 utilisé dans le mélanome et les cancers pulmonaires. L'Atezolizumab et l'Avelumab sont des anticorps monoclonaux anti-PD-L1 validés dans les cancers urothéliaux.

Leur généralisation récente à plus large échelle permet d'évaluer avec plus de précision leur tolérance et les risques de toxicité dysimmunitaire imputables à ces molécules (Postow et al., 2018) (**Fig.18**). Par leurs mécanismes d'actions, ces molécules peuvent induire une augmentation d'activité des lymphocytes T effecteurs, des auto-anticorps dirigés contre des antigènes du soi et provoquer des toxicités aiguës d'organes comme des colites inflammatoires, des pneumopathies ou myocardites auto-immunes (**Fig.19**).

La toxicité des anti CTLA-4 est en général plus sévère (Robert et al., 2015) (Khoja et al., 2017) avec des colites et des hypophysites, alors que les atteintes pulmonaires (Naidoo et al., 2017) et les thyroïdites (Abdel-Rahman et al., 2016) semblent plus fréquentes au cours des traitements par anti-PD1 (Morganstein et al., 2017). La survenue de ce type d'effets indésirables liés au traitement peut alors nécessiter l'utilisation ponctuelle de corticoïdes à forte posologie.

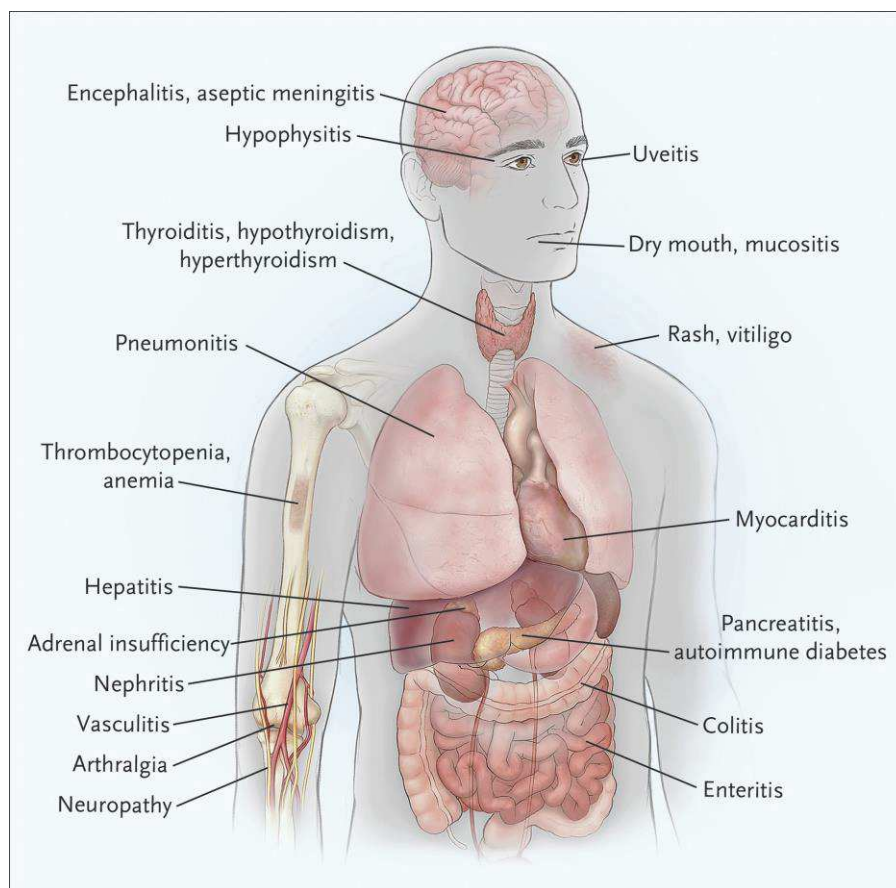


Figure 19 : Les principales atteintes d'organe dans le cadre de la toxicité des biothérapies (Postow et al., 2018)

7. Les modèles animaux utilisés pour l'étude de l'IS post septique

Le développement de cette nouvelle thérapeutique nécessite des modèles pré thérapeutiques animaux. Concernant le sepsis ces derniers présentent tous des avantages mais aussi des limites concernant l'applicabilité des biothérapies secondairement à l'homme.

- **Modèle « aseptique » d'induction de réponse au LPS** (De Wilde et al., 2009): permettant l'étude des mécanismes d'activation et d'inhibition immuns, mais ils sont peu superposables aux réalités cliniques.

- **Modèle de lésion cutanée thermique** (Ni Choileain et al., 2006): permettant comme les modèles de choc hémorragique, ou de traumatisme crânien, d'étudier des mécanismes similaires de réponse de l'organisme au stress. Mais n'intégrant pas, comme pour le modèle de réponse au LPS, la complexité de la réponse microbienne.

- **Modèle de sepsis induit par une péritonite induite par ponction ligature caecale** (Zhu et al., 2013) : il s'agit d'un modèle très utilisé, plus proche des conditions cliniques humaines, mais nécessitant une procédure opératoire complexe. En effet, ce modèle induit une forte létalité, nécessitant le recours à une antibiothérapie dont les effets sur l'immunité ne sont pas toujours évalués. Enfin, ce modèle de sepsis par translocation digestive n'est pas spécifique d'une entité pathogène, la flore digestive des souris variant selon le site de la ponction digestive (jéjunale ou colique) et pouvant varier d'une souris à l'autre mais également d'un laboratoire à l'autre.

Nous avons donc développé un nouveau modèle d'infection, dit « double HIT », spécifique d'un pathogène fréquemment rencontré en clinique humaine (*S. aureus*), avec une moindre létalité, une plus forte reproductibilité et spécificité que les modèles déjà utilisés. Nous éprouverons le niveau d'immunosuppression induit par le premier HIT (bactériémie à *S. aureus*) à l'aide d'un second HIT, par une pneumopathie à *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), l'objectif étant de s'approcher au maximum des observations et préoccupations en clinique humaine.

Le développement de biothérapies avec de nouvelles cibles thérapeutiques plus spécifiques semble indispensable. Les lymphocytes Treg sont au cœur des mécanismes de régulation de la réponse immunitaire et sont donc des candidats pour de nouveaux traitements du cancer et de l'IS post septique (Kumar et al., 2019).

III. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS

1. Historique et description des sous-populations de lymphocytes T régulateurs

a) Découverte des lymphocytes T régulateurs

En 1969, la réversibilité des dysfonctions auto-immunes induites par la thymectomie précoce de souris, par le transfert de lymphocytes T CD4 de souris saines (Nishizuka and Sakakura, 1969) (Gershon and Kondo, 1971) a démontré pour la première fois l'existence de lymphocytes T CD4 aux capacités régulatrices de la réponse inflammatoire (**Fig20**).

Dans les dix années suivantes, Sakaguchi démontre que la forte expression du marqueur lymphocytaire T CD5 (Sakaguchi et al., 1985) puis de CD25 (sous unité α du récepteur à l'IL2)(Powrie and Mason, 1990) (Sakaguchi et al., 1995) permet d'identifier plus finement ces lymphocytes T CD4 aux fonctions immunomodulatrices (Kuniyasu et al., 2000) (Fisson et al., 2003).

L'identification du facteur de transcription « FoxP3 » dans les années 2000 (Bennett et al., 2001) (Wildin et al., 2001) a permis de mieux distinguer les lymphocytes Treg des lymphocytes Tconv activés (exprimant également le CD25).

Les études sur les souris scurfy (Godfrey et al., 1991) puis chez l'homme ont montré que l'inactivation de FoxP3 (Bennett et al., 2001) était responsable de troubles dysimmunitaires sévères, identifié chez l'homme comme syndrome « IPEX » (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome) en lien avec l'absence de Treg FoxP3 (Van Gool et al., 2019).

Le facteur de transcription FoxP3 reste à ce jour un acteur central de la fonction immunosuppressive de la population lymphocytaire T reg (Yagi et al., 2004) (Buckner and Ziegler, 2008). Ce marqueur manque de spécificité chez l'homme, où l'expression de FoxP3 peut être induite transitoirement par les lymphocytes Tconv activés (Walker et al., 2003) ou absente de certaine population Treg. D'autres marqueurs d'identification comme ICOS (inductible T-cell COStimulator)(Ito et al., 2008), CD45RA et l'absence d'expression de CD127 (récepteur à l'IL-7)(Liu et al., 2006)(Mazzucchelli and Durum, 2007) (Aerts et al., 2008a) permettent de mieux définir cette population.

Contrairement à l'homme, les Treg murins présentent une expression plus constante de FoxP3, permettant de définir la population Treg de manière commune comme **CD4+FoxP3+** avec une meilleure spécificité.

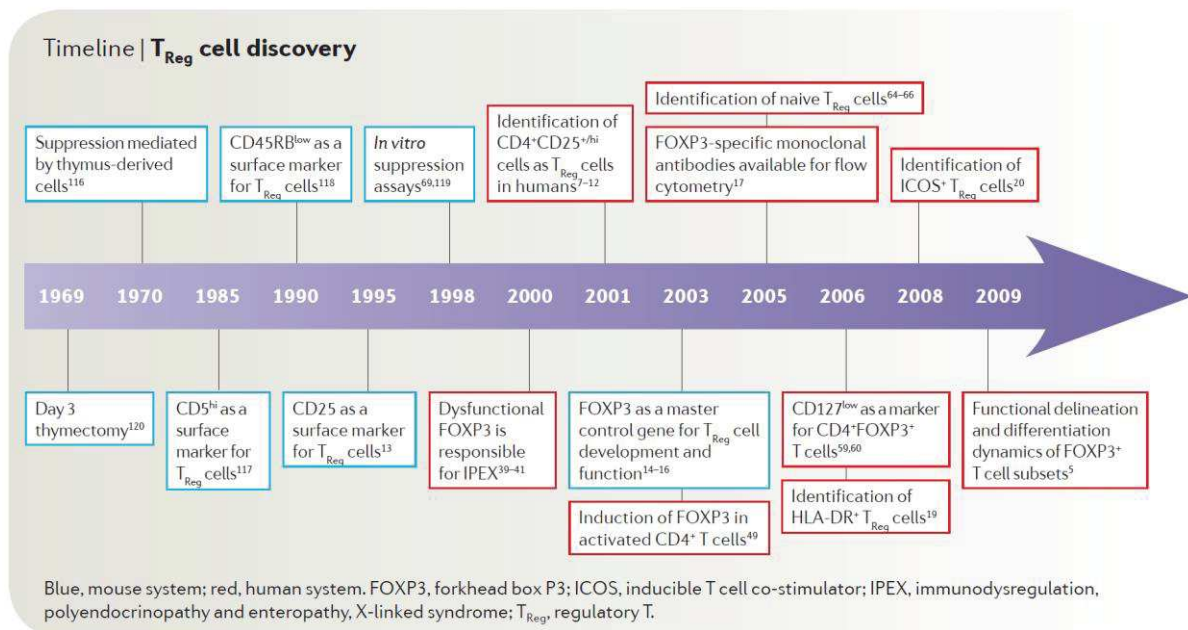


Figure 20 : Historique de la découverte des Treg (Sakaguchi et al., 2010).

b) Les sous-populations de lymphocytes Treg

La population T régulatrice correspond à un ensemble d'une grande hétérogénéité phénotypique s'expliquant par l'existence de multiples sous populations définies par leur origine et leur niveau d'expression de FoxP3.

- les **Treg FoxP3+**, dit **Treg conventionnels** parmi lesquels on définit les **tTreg** (différenciation **d'origine thymique**), avec différents stades d'activation, **cTreg (central Treg)** avec haut niveau d'expression de CD62L et CCR7 (Liston and Gray, 2014), peuvent se différencier après stimulation de leur TCR (Levine, A. G. Nat. Immunol.15, 1070–1078 2014) en **eTreg** CD62L^{lo} (Treg effecteurs) puis migrer dans les organes non lymphoïdes (Smigielski et al., 2014) (Rosenblum et al., 2016) et surexprimer les marqueurs ICOS, CTLA-4 (Levine et al., 2014) (Smigielski et al., 2014) (Ito et al., 2008) (Dias et al., 2017).
- Les **eTreg**, sous la dépendance des facteurs de transcription **T-bet**, **Blimp1**, **IRF4** et **STAT 3** peuvent se polariser pour cibler plus spécifiquement une sous-population lymphocytaire (**fig.21**). L'expression des facteurs de transcription nucléaires **T-bet**, **Blimp1** associée à l'expression de **CXCR3** orientent la réponse inhibitrice des Treg vers une réponse de type **Th1**, (Koch et al., 2009). L'expression du facteur de transcription nucléaire **IRF4** est associée à l'inhibition de la réponse **Th2** (Zheng et al., 2009). L'inhibition plus spécifique la voie **Th17** est

sous la dépendance du facteur de transcription **STAT 3** (Chaudhry et al., 2009) (Levine et al., 2017) (Yu et al., 2015) (Wohlfert et al., 2011) (Ohnmacht et al., 2015)

- Enfin, les **eTreg** exprimant **CXCR5** sous dépendance du facteur de transcription **Bcl-6** régulent plus spécifiquement l'activité des lymphocytes T folliculaires (Tfh) des centre germinatifs (Chung et al., 2011).

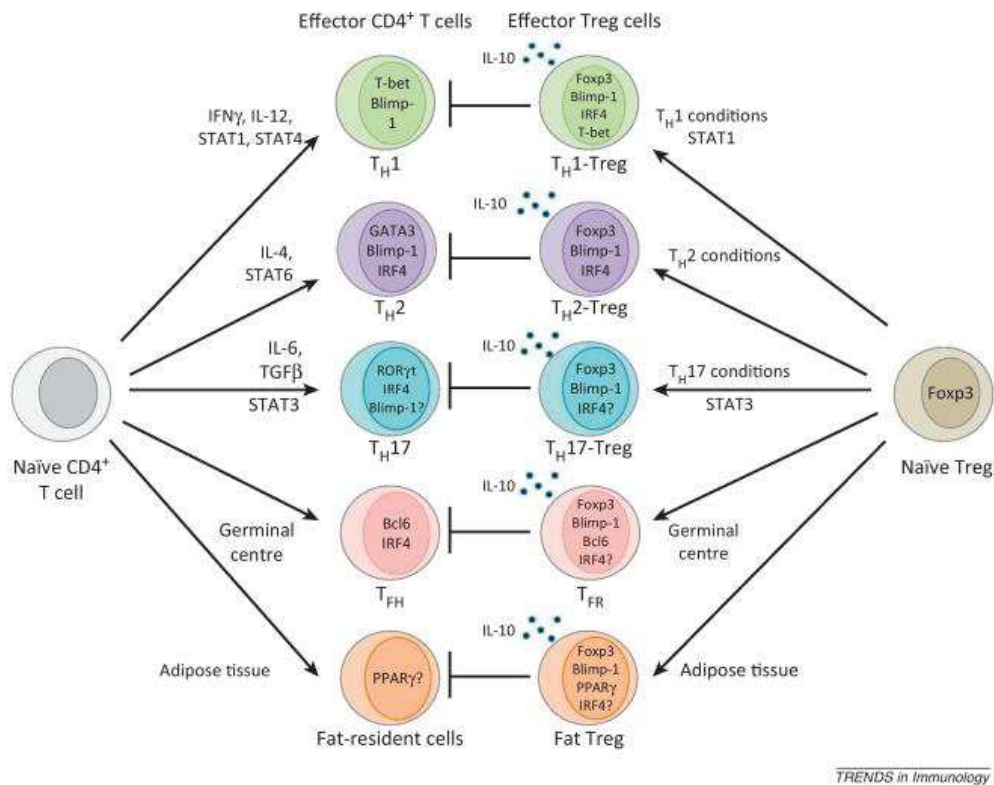


Figure 21 : Les sous types de lymphocytes Treg (Cretney et al., 2013)

- Les **Treg périphériques (pTreg)** sont générés *in vivo* à partir de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels (Th0) en lymphocytes Treg. Ils sont à différencier des Treg induit *in vitro* à partir de lymphocytes T CD4⁺ conventionnels appelé eux « Treg induits (iTreg) ».

c) Les lymphocytes T régulateurs thymiques

Au cours de la maturation du système immunitaire, les lymphocytes T développés à partir de progéniteurs issus des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, migrent dans le thymus où ils subissent une première étape de sélection positive permettant la survie des cellules T immatures capables de reconnaître le CMH du soi. Dans un second temps, parmi les lymphocytes T sélectionnés, ceux possédant un TCR auto-réactif de haute affinité pour le couple « peptide du soi - CMH » exprimé par les cellules épithéliales thymiques (antigènes du soi exprimés sous la dépendance du facteur de transcription AIRE, Auto-Immune REgulator) vont entrer en apoptose. Cette phase de sélection négative est essentielle au développement de la tolérance aux antigènes du soi et limiter les réactions auto-immunes (Singer et al., 2008).

Certains de ces thymocytes qui reconnaissent les antigènes du soi avec une affinité intermédiaire, vont échapper à cette sélection négative, survivre et devenir des **cellules T régulatrices exprimant FoxP3**. Ces Treg d'origine thymique, « **Natural Treg** » font partie des acteurs principaux de la tolérance du soi. La spécificité de leur TCR pour les antigènes du soi expliquent leurs fonctions inhibitrices sur les lymphocytes T CD4, CD8 et cellules présentatrices d'antigènes (CPA) lors de leur activation en réponse aux dommages cellulaires de l'hôte (Hsieh et al., 2004).

L'activation de leur TCR associé aux signaux de costimulation médiés par l'IL-2 et le TGF β notamment, sont nécessaires pour permettre leur différenciation en Treg (Fontenot et al., 2005). La stimulation de leur TCR induit une forte expression de CD25 (la sous unité α du récepteur à IL-2), et permet l'activation de STAT5 qui stabilise l'expression de FoxP3 (Burchill et al., 2008). Le TGF β favorise quant à lui la survie des Treg thymiques (Ouyang et al., 2010).

d) Les lymphocytes T régulateurs périphériques

Les **Treg périphériques (pTreg)** sont une population de lymphocytes T régulateurs à différencier des **Treg thymiques**. Cette population se distingue des « naturel Treg » à la fois par leur origine et leurs fonctions. Les pTreg sont issus de la conversion, en contexte inflammatoire, de lymphocytes T CD4+CD25- conventionnels (Th0) en Treg CD4+CD25+FoxP3+ (Apostolou et al., 2002) leur conférant des fonctions immunosuppressives.

L'induction de la tolérance à des antigènes administrés par voie orale dans un modèle murin, (Richman et al., 1978) a permis de mettre en évidence l'existence de cette population de pTreg inductibles. Les pTreg semblent préférentiellement produit au niveau des muqueuses, des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissues) et des plaques de Peyer. Leur différenciation est favorisée par la richesse du micro-environnement en IL-2 et le TGF- β (Mucida et al.,

2009) (Atarashi et al., 2011)(Lathrop et al., 2011). Le TGF- β agit sur le récepteur TGF β -R1 et permet l'expression de FoxP3 (Horwitz et al., 2008). L'IL-2 favorise la différenciation en pTreg. En effet l'IL-2 permet l'activation de STAT5, qui inhibe l'expression de ROR γ T et la différenciation vers la voie Th17, favorisant la différenciation pTreg au dépend des Th17 (Laurence et al., 2007).

Les répertoires TCR des pTreg et tTreg présentent une faible homologie (Lathrop et al., 2011) témoignant de leur fonctions régulatrices distinctes. Ainsi les pTreg sont essentiellement impliqués dans la physiopathologie des phénomènes allergiques et dans le rejet de greffe. En contexte d'infections, l'induction de pTreg contribue au contrôle local de l'inflammation, mais pourrait également être impliquée dans la persistance de foyer infectieux et favoriser sa chronicisation (Belkaid et al., 2002)(Scott-Browne et al., 2007).

e) Les lymphocytes Treg non FoxP3

Il existe également des populations de lymphocytes T régulateurs n'exprimant pas FoxP3, dont les **lymphocytes Treg « Tr1 »** (Groux et al., 1997) (Vieira et al., 2004). Ils sont induits à partir des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, par des cellules dendritiques tolérogéniques, dans un microenvironnement riche en IL-10 et IL-27 (Apetoh et al., 2010)(Awasthi et al., 2007). Cette population est impliquée en transplantation d'organe, de moelle osseuse et dans les maladies dysimmunitaires (Astier et al., 2006)(Gagliani et al., 2010). Les **Treg « Th3 »** sont une autre population de Treg non FoxP3, issue de lymphocytes CD4⁺, favorisé par un microenvironnement riche en TGF- β et de l'IL-4 (Seder et al., 1998) Ils sont impliqués dans l'immunité des muqueuses, en inhibant les lymphocytes Th1 et Th2 par leur forte expression d'IL-10 et de TGF- β (Carrier et al., 2007).

2. Les marqueurs phénotypiques des lymphocytes T régulateurs chez la souris et l'homme

a) Chez la souris

Chez la souris, la définition consensuelle des lymphocytes Treg est l'association des marqueurs **CD4+** et **FoxP3+**. Il définit de manière globale, la population des **tTreg (Thymique)**, qui est majoritairement localisée dans les organes lymphoïdes secondaires, alors aussi appelé **cTreg** pour « **central Treg** ».

CD25 est la protéine correspondant à la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2. Son niveau d'expression constitue un marqueur de l'état d'activation et du pouvoir inhibiteur des Treg (Chen et al., 2007). Cependant comme nous l'avons déjà évoqué, le CD25 est un marqueur qui manque de spécificité pour définir à lui seul la population Treg. En effet, les lymphocytes T effecteurs et lymphocytes T mémoires peuvent au cours de leur activation exprimer le CD25 (Thornton and Shevach, 1998). Il est également important de noter que les lymphocytes Treg **CD25^{low}** présentent un pouvoir immunosuppresseur (Olivares-Villagómez et al., 2000) (Annacker et al., 2001) (Gavin et al., 2002) notamment, en contexte tumoral ou de maladie inflammatoire digestive (Leithäuser et al., 2006) (Nishioka et al., 2006).

FoxP3 est considéré comme le facteur de transcription central de régulation de l'activité suppressive des Treg. Il s'agit d'un facteur de transcription intranucléaire, son marquage nécessite donc une fixation et une perméabilisation cellulaire limitant son utilisation à des études phénotypiques. La création de souris **Knock 'in FoxP3-GFP** (utilisées dans notre travail) permettent d'identifier les Treg sans induire leur mort cellulaire. Cependant, plus de 50% des cellules FoxP3+ ont une activité suppressive limitée, FoxP3 n'est donc pas un marqueur discriminant pour identifier les Treg les plus immunosuppresseurs (Chen et al., 2010a).

Les récepteurs aux chimiokines et cytokines déterminent la localisation des différentes sous-populations de Treg. Les récepteurs **CCR7** et **CD62L** (L-selectine) sont hautement exprimées par les **cTreg naïfs** et leurs permettent de se maintenir (phénomène de homing) au niveau des organes lymphoïdes secondaires (pulpe blanche splénique). À la suite de leur activation, par la co-stimulation de leur TCR et de l'IL-2, les cTreg acquièrent un phénotype activé, devenant alors des **Treg effecteurs (eTreg) (Tabl.3)**. Les **eTreg** expriment des molécules inhibitrices comme **l'IL-10, CTLA-4, ICOS, TIGIT**. La baisse de leur expression de **CD62L** et de **CCR7** est associée à leur migration vers les organes lymphoïdes et les sites inflammatoires. Cette perte d'expression du CD62L et du CCR7 s'accompagne alors d'une augmentation d'expression de récepteurs aux chimiokines les guidant vers les organes cibles. **L'expression de CCR4** est associée à leur migration vers la **peau et le poumon** permettant de limiter la réaction inflammatoire. Les **eTreg à tropisme intestinal** coexpriment le **CCR9** et **CCR6**. **CXCR3**

est quant à lui particulièrement exprimé par la sous population de eTreg inhibant les lymphocytes de type **Th1**.

Les intégrines jouent également un rôle majeur dans le maintien des Treg dans les tissus les plus inflammatoires. Les eTreg **CD103+ (αE integrin)** sont par exemple retrouvés dans la peau et le tissu pulmonaire en contexte inflammatoire (Nakahashi-Oda et al., 2016).

Les **eTreg matures** expriment également le **facteur de transcription Blimp-1** (B-lymphocyte-Induced Maturation Protein 1). Ce facteur de transcription est essentiel pour la production de **l'IL-10** et permet la migration des eTreg vers les organes non lymphoïdes, entraînant la perte d'expression du récepteur CCR7 et l'expression du récepteur à IL-33 (ST2)(Cretney et al., 2011).

Les principaux marqueurs permettant de distinguer les cTreg et eTreg sont présentés dans le **Tableau3** :

« Central Treg »	« Effector Treg »
Principalement dans les organes lymphatiques secondaires et la pulpe blanche splénique	Principalement dans les organes non lymphoïdes et la pulpe rouge splénique
FoxP3+	FoxP3+
Blimp-1-	Blimp-1+
CD62L+	CD62L-
CCR7+	CCR7-
IL10-	IL10+

Tableau 3: synthèse des marqueurs différenciellement exprimés chez le central Treg et Treg effecteurs

Le CTLA-4 (CD152) est exprimé de manière constitutionnelle par environ 40% des lymphocytes Treg chez la souris. Il peut également être exprimé par les lymphocytes Teff activés, où il est alors considéré comme un marqueur d'épuisement lymphocytaire (Takahashi et al., 2000). L'expression de CTLA-4 par les Treg constitue un marqueur fiable de suivi de leur niveau d'activation. Il permet d'identifier les Treg au pouvoir inhibiteur le plus élevé.

L'expression CD127 (IL-7R alpha) varie beaucoup chez les Treg murins en fonction de leur localisation et de leur niveau d'activation, même s'il reste moins exprimé que sur les Teff (Cozzo et al., 2003) (Simonetta et al., 2010).

b) Chez l'homme

Chez l'homme, comme chez la souris, **FoxP3** présente un rôle fonctionnel majeur pour les Treg. Comme nous l'avons déjà évoqué, il peut cependant être exprimé par des **lymphocytes effecteurs activés** sans activité immunosuppressive (Allan et al., 2007a), par les lymphocytes **CD8+**, **Natural Killer activés** (Allan et al., 2007a). Seule l'expression prolongée de FoxP3 permet d'acquérir des propriétés immunosuppressives (Tran et al., 2007) (Walker et al., 2003). L'expression de foxP3 est donc moins discriminante pour identifier les Treg chez l'homme que chez la souris. FoxP3 est un marqueur nécessaire mais non suffisant chez l'homme pour identifier les Treg d'origine thymiques. Chez l'homme, l'expression de **FoxP3**, nécessite donc l'utilisation de marqueurs phénotypiques complémentaires pour identifier les Treg.

La co-expression de **CD4+CD25+** a beaucoup été utilisée pour définir une population de lymphocytes enrichis en Treg fonctionnels au sein des PBMC (Ng et al., 2001). Cependant, plus de 30% des CD4+ parmi les PBMC expriment CD25, incluant en partie des lymphocytes effecteurs activés. Une minorité des CD4 CD25^{high} sont chez l'homme des Treg avec un haut niveau d'expression nucléaire de FoxP3 (Baecher-Allan et al., 2001a) (Baecher-Allan et al., 2002a) (Miyara et al., 2009). En effet, près de 50% des Treg FoxP3+ n'expriment qu'un niveau d'expression intermédiaire de CD25 et certains n'expriment pas CD25. L'identification chez l'homme des Treg sur le seul niveau de CD25 entraîne la perte d'une partie des Treg CD4+Foxp3+ (Chen et al., 2010b).

Les Treg sont caractérisés par **une faible expression du récepteur à l'IL-7 (CD127)**. Le faible niveau d'expression de CD127 associé à l'expression de CD25 est utilisé fréquemment pour identifier les Treg humain fonctionnels, notamment en contexte inflammatoire (Liu et al., 2006) (Seddiki et al., 2006a). Cependant, seulement 40% des Treg CD127^{low} sont Foxp3+ (Shevach, 2006a). Le co-marquage CD25^{high} et CD127^{low} nécessite également l'utilisation de marqueurs complémentaires.

Comme chez la souris, les Treg humains activés expriment un niveau élevé **de CTLA-4**, ce qui permet d'identifier les Treg les plus immunosuppresseurs (Jonuleit et al., 2001).

L'expression de **CD45RO et CD45RA est exclusivement humaine**. Elle permet de différencier les sous population **cTreg et eTreg parmi les tTreg** (Miyara et al., 2009) sur les bases suivantes :

- Les **cTreg « naïfs »** sont décrit comme **CD4+CD25+CD45RA⁺FoxP3^{LOW}**, avec un faible pouvoir inhibiteur. La faible expression de **ki67**, marqueur de prolifération, renforce cette idée (Miyara et al., 2009).
- Les **eTreg CD45RO⁺CD45RA⁻FoxP3^{high}**, exprimant **ki67, TIGIT, CD39, ICOS et IL-10** possèdent un plus puissant pouvoir inhibiteur.

Chez l'homme et la souris certains marqueurs peuvent avoir des rôles différents, comme ICOS. Chez la souris, il permet d'identifier les Treg les plus suppresseurs alors que chez l'homme son expression n'est pas en lien avec le pouvoir inhibiteur des Treg (Ito et al., 2008).

L'identification des Treg périphériques (pTreg)

La distinction entre nTreg et pTreg fait encore débat. Le facteur de transcription **HELIOS** proposé par l'équipe de Shevach pour identifier les nTreg des pTreg ne semble pas assez spécifique, les Treg induits *in vitro* exprimant le facteur de transcription Helios (Thornton et al., 2010) (Verhagen and Wraith, 2010). Les groupes de Bluestone et Lafaille ont proposé la neuropilin-1 afin distinguer ces deux populations, cependant comme pour Helios, les pTreg en conditions inflammatoires sont décrits comme pouvant exprimer un haut niveau de neuropilin-1, comparable à celui des nTreg (Weiss et al., 2012) (Yadav et al., 2012) (Delgoffe et al., 2013).

3. Activation des lymphocytes T régulateurs thymiques

a) Rôle du TCR

Les fonctions inhibitrices des Treg ont été mise en évidence par la démonstration de leurs fonctions inhibitrices sur la prolifération des Tconv stimulés *in vitro* (Thornton and Shevach, 1998). Cette inhibition nécessite l'activation préalable des Treg par leur TCR (Levings et al., 2001) (Dieckmann et al., 2001) (Jonuleit et al., 2001). Les Treg activés par l'antigène spécifique de leur TCR exercent alors leur fonctions inhibitrices sur une réponse pouvant impliquer d'autres cibles antigéniques (Yu et al., 2005) (Yu et al., 2005a). La sensibilité des Treg à leur antigène est nettement plus grande que celle des Tconv pour le même antigène (Takahashi et al., 2000).

La stimulation de leur TCR permet l'engagement et la fixation des facteurs de transcription **NFAT** et **AP-1** sur le promoteur de **FoxP3** permettant son expression chez les Treg (Okada et al., 2014). Ce promoteur est très conservé entre les espèces humaines et murines. Il contient de nombreuses séquences non codantes dont trois (CNS1, CNS2, CNS3) qui sont principalement impliquées dans l'initiation et la stabilité de l'expression de FoxP3 (**Fig.22**).

La séquence **CNS3** n'est pas indispensable au maintien de l'expression de FoxP3, mais sa déméthylation permet à la protéine Rel l'induction de la transcription de FoxP3 lors de la phase initiale du développement des Treg (Feng et al., 2015).

CNS2 est la zone non codante impliquée lors de la stimulation du TCR. La déméthylation de CNS2 (Toker et al., 2013) permet le maintien de l'expression de FoxP3, par la fixation des molécules **Rel**,

Runx1, STAT5 et FoxP3. Le niveau de méthylation de CNS2 par la déméthylase TET1 détermine la stabilité des Treg et leurs capacités immunosuppressives.

CNS1 est impliqué dans l'expression de FoxP3 chez les pTreg suite à la stimulation par le TGFβ (Schlenner et al., 2012) et l'expression de **Smad 2 et 3**. CNS1 n'est pas impliqué dans l'expression de FoxP3 chez les tTreg (Josefowicz et al., 2012) (Takaki et al., 2008) (Tone et al., 2008). **Il joue un rôle essentiel dans la génération des pTreg et non pas des tTreg (Zheng et al., 2010).**

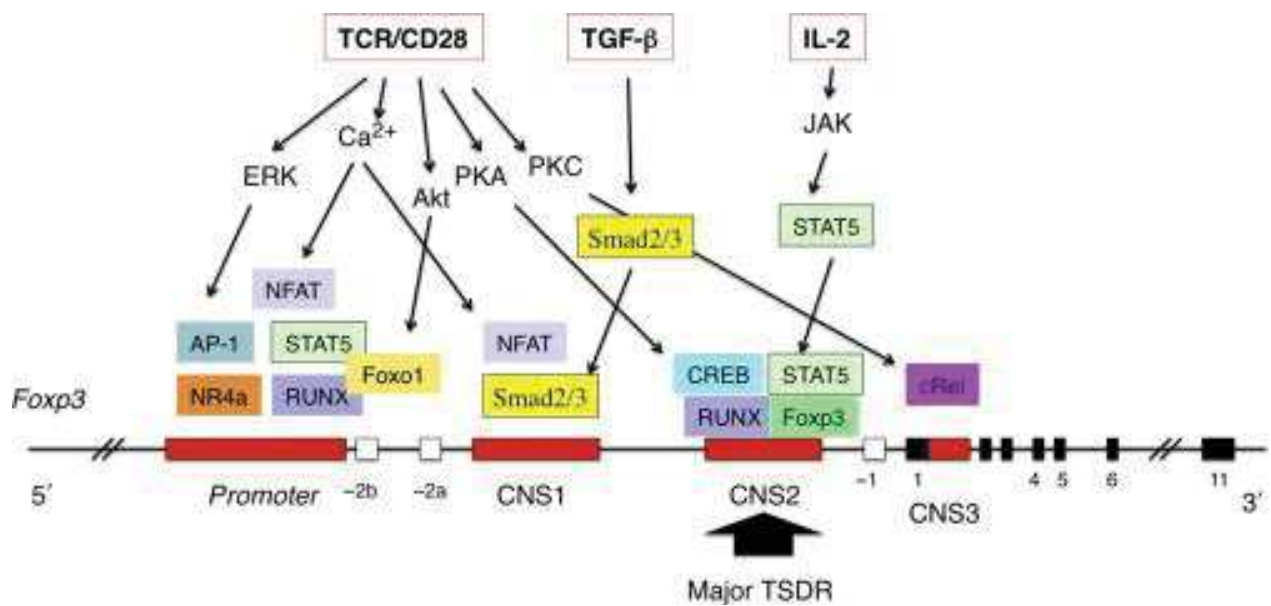


Figure 22 : Voies de stimulation intracellulaire permettant l'activation des lymphocytes Treg (Lu et al., 2017)

b) Rôle de la voie IL2/STAT5 dans l'activation et la stabilité des tTreg

Depuis plus de 20 ans il a été rapporté que **l'IL-2** est nécessaire pour prévenir la survenue de pathologies dysimmunitaires, les souris déficientes en IL-2 présentent de manière spontanée des colites inflammatoires sévères accompagnées d'une hyperactivation lymphocytaire T (Sadlack et al., 1993). Son récepteur, le CD25 est l'un des marqueurs historiques de la population Treg. Son rôle fonctionnel est majeur, les souris IL2rb^{-/-} présentant une population Treg non fonctionnelle et des troubles dysimmunitaires réversibles par le transfert de Treg CD25⁺ (Malek et al., 2002). La stimulation du **CD25 des Treg au niveau thymique, permet la phosphorylation de STAT5 via la voie JAK, puis sa fixation sur CNS2** permettant la transition de FoxP3. Cette voie est essentielle pour stabiliser l'expression de FoxP3.

Le **TNF α** (Tumor Necrosis Factor α)(Nguyen and Ehrenstein, 2016) peut également favoriser l'expansion des Treg via la voie STAT5, alors que l'IL-6 et l'IL-21 via leur action sur STAT3 diminuent la transcription de Foxp3 (Laurence et al., 2007).

c) Rôle des facteurs de transcriptions nucléaires

La différenciation des cTreg en **Treg effecteurs** est sous la dépendance de facteurs de transcription nucléaire distincts de FoxP3 (Cretney et al., 2011). Le facteur de transcription **IRF4** agit sous la dépendance de FoxP3 (Zheng et al., 2009) pour le contrôle de **la sous population Th2**.

Le facteur de transcription **Blimp-1** est le transcrit du gène Prdm1. C'est un répresseur transcriptionnel décrit dans la différenciation plasmocytaire (Nutt et al., 2007) (Kallies and Nutt, 2007). Il permet le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T, les souris inactivées spécifiquement pour blimp-1 dans les lymphocytes présentent une prolifération lymphocytaire T et développent des troubles dysimmunitaires, comme des colites et des atteinte pulmonaire inflammatoire (Kallies et al., 2006) (Martins et al., 2006). La transcription de Blimp-1, induite par l'IL-2, permet par une boucle de rétrocontrôle négative, d'inhiber la sécrétion d'IL-2 (Gong and Malek, 2007). L'expression de **Blimp1** est limitée à une sous-population de **Treg effectrices matures, exprimant l'IL-10 et ICOS**.

Le facteur de transcription IRF4 régule également l'expression de Blimp1 dans les cellules Treg. Blimp-1 et IRF4 agissent ensemble pour réguler l'expression de l'IL-10 et de CCR6. Leur expression signe le profil de **Treg effecteurs**.

4. Les fonctions effectrices des Lymphocytes T régulateurs

Les Treg sont essentiels à l'homéostasie des cellules immunitaires et au contrôle des réactions inflammatoires. Les mécanismes d'inhibition des Treg sont multiples : **contact dépendant, médiés par des cytokines**, par des **perturbations du métabolisme local** ou encore par **effets cytotoxiques directs** (Fig.23).

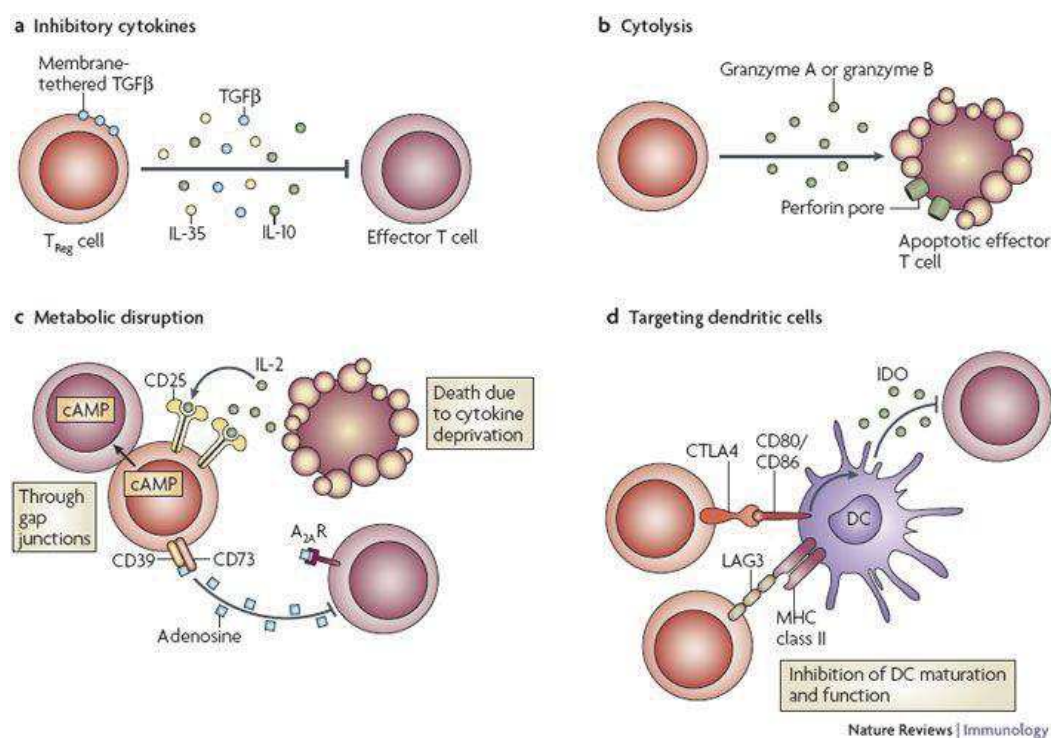


Figure 23 : Les mécanismes d'action des Treg (Hotchkiss et al., 2013b)

a) Mécanismes d'inhibition contact dépendant

L'un des mécanismes d'action majeur des Treg est l'inhibition des cellules présentatrices d'antigènes. **CTLA-4** est la molécule inhibitrice principalement impliquée, elle agit de manière compétitive et **antagoniste du CD28 des lymphocytes T sur les co-récepteurs CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2)**. CTLA-4 inhibe le signal de costimulation positif normalement assuré par CD28 (Lenschow et al., 1996) et induit la dégradation des récepteurs CD80 et CD86. CTLA-4 est caractérisé par une affinité beaucoup plus forte pour CD80 et CD86 que CD28. Il permet d'induire l'inhibition des CPA (Collins et al., 2002) (Tadokoro et al., 2006).

L'interaction du CTLA-4 avec CD80 et CD86 conduit également à l'expression par les cellules dendritiques de **indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)**, aux effets **pro-apoptotiques** sur les lymphocytes

T effecteurs par la dégradation enzymatique du **tryptophane** (Fallarino et al., 2003) (Mellor and Munn, 2004).

Les Treg par l'expression de **CTLA4, IL-10 et TGFβ** inhibent également les **cellules dendritiques**, les **monocytes et macrophage** (Taams et al., 2005) (Tiemessen et al., 2007).

Les Treg par l'expression de **Lag-3 (CD223)** (Serra et al., 2003) (Misra et al., 2004) inhibent également la maturation des **cellules dendritiques**. Lag-3 est un homologue de CD4, capable de se fixer au CMHII avec une haute affinité (Workman and Vignali, 2005) (Huang et al., 2004) (Liang et al., 2008).

Les Treg sont également décrit comme capables d'**éliminer de manière directe les peptides au sein même du CMH II à la surface des DC** et ainsi réduisent leur capacité à stimuler les lymphocytes Tconv spécifique d'Ag (Akkaya et al., 2019).

L'induction d'apoptose par les **Treg via la voie Fas/FasL (CD95/CD95L)** est également rapportée comme un mécanisme d'induction directe d'apoptose des lymphocytes T CD8+ (Strauss et al., 2009) et des macrophages (Venet et al., 2006).

PD1 appartient à la famille des corécepteurs inhibiteurs, son expression par les Treg et sa liaison avec PD-L1 et PD-L2 contribue à l'échappement immunitaire au cours des processus tumoraux (Kumar et al., 2019).

b) Mécanismes d'inhibition cytokines dépendant

Le **TGFβ** exprimé par les Treg assure un puissant rôle anti-inflammatoire, il favorise une boucle d'auto-entretien par la stabilisation d'expression de FoxP3 chez les Treg (Andersson et al., 2008). Il induit la production d'**IDO** et la différenciation de **Treg induit à partir de Tconv** (Chen et al., 2003), tout en réduisant la différenciation des Th17 (Bettelli et al., 2006).

L'IL-10 produite par les Treg agit en inhibant les fonctions des cellules dendritiques (Ito et al., 2008) et en favorisant l'induction de **Treg induits (Tr1) à partir de Tconv** (Belkaid, 2007) (Roncarolo et al., 2006).

L'expression de **galectine 1** favorise l'arrêt du cycle cellulaire puis l'apoptose des lymphocytes Tconv (Garín et al., 2007).

c) Mécanismes d'inhibition par modification du métabolisme

Les modifications du micro-environnement par les Treg sont l'un des mécanismes d'inhibition sur le métabolisme des T effecteurs. La **forte expression de CD25** par les **eTreg** participe à la privation locale

en IL2 des cellules voisines. La baisse d'IL-2 favorise l'anergie et l'apoptose lymphocytaire (Höfer et al., 2012).

CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase et CD73/ecto-5'- nucleotidase sont exprimés par les Treg. Ce sont deux co-enzymes capables de générer de l'adénosine péri cellulaire à partir de l'ATP et de stimuler le récepteur A2A des lymphocytes T (Sorrentino et al., 2019)(Deaglio et al., 2007). Dans un modèle murin, les agonistes du récepteur A2AR induisent une perte de prolifération et d'activation lymphocytaire (Airas et al., 1995).

d) Mécanismes d'inhibition par effets cytotoxiques directs

Les Treg activés sont capables de **libérer des microvésicules** contenant des molécules de **perforine et granzyme** (Grossman et al., 2004) (Gondek et al., 2005) pour induire l'apoptose des Teff sans engagement spécifique de leur TCR.

L'ensemble de ces mécanismes inhibiteurs constitue également des marqueurs phénotypiques du stade d'activation des Treg.

5. Le Tumoral Necrosis Factor

a) Historique du TNF α

Le TNF α (Tumoral Necrosis Factor α) est une cytokine pléiotrope qui joue un rôle majeur dans l'initiation de la réponse inflammatoire. Il a initialement été découvert en 1983 comme facteur cytotoxique pour les cellules tumorales permettant la régression tumorale chez l'homme (Coley, 1891) et la souris (Aggarwal, 2003). Il appartient à la « superfamille » du TNF composée de 19 membres agissant sur 29 types de récepteurs distincts (**Fig.24**). Il y a plus d'un siècle, P. Bruns un chercheur allemand fait l'observation de la régression de tumeurs chez l'homme dans les suites d'une infection bactérienne. Par la suite des extraits bactériens sont utilisés par W. Coley à visée antitumorale avec succès. En 1944, Shear et al. démontrent que l'efficacité contre le développement tumoral est liée plus spécifiquement au lipopolysaccharide (LPS) bactérien, puis O'Malley découvre que cet effet est médié par un facteur sérique, renommé par L. Old's group comme **tumor-necrosis factor** (Carswell et al., 1975). Le TNF est initialement identifié comme étant d'origine macrophagique puis secondairement lymphocytaire B.

La lymphotoxine (LT) est quant à elle décrite en 1968 par G. Granger (Williams and Granger, 1968), comme étant une protéine d'origine lymphocytaire impliquée dans la destruction des cellules tumorales. En 1984, la purification de ces protéines (Aggarwal et al., 1984), permet de rapprocher ces deux acteurs et de renommer le **TNF en TNF α et le LT en TNF- β** . Le TNF α est alors décrit chez la souris comme responsable de la cachexie induite par le LPS (Beutler et al., 1985). Le TNF α est identifiée comme une cytokine majeure de la réponse pro-inflammatoire aux cours des infections et maladies inflammatoires. Son administration chez l'homme s'accompagne d'hyperthermie, destruction tissulaire et état de choc à plus forte dose (Dinarello, 2000). Le TNF peut être à la fois inducteur de la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation et de l'apoptose.

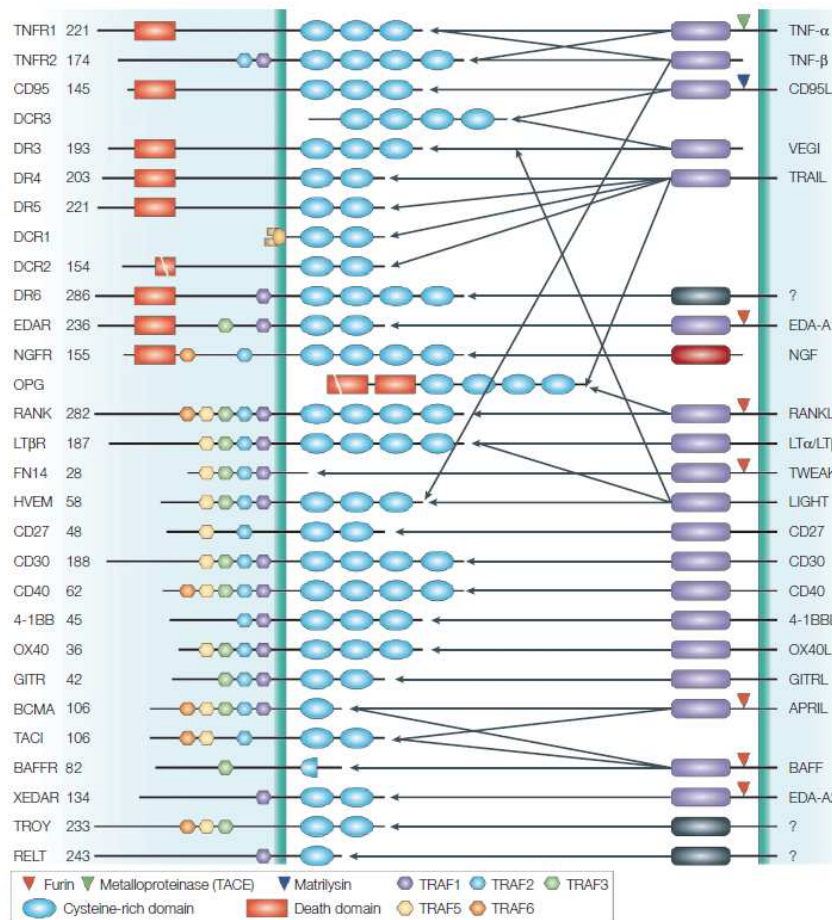


Figure 24 : La « superfamille du TNF » (Aggarwal, 2003)

Le **TNFα** est une protéine **transmembranaire (mTNFα)** qui peut être clivée par la TNFα Converting Enzyme (TACE) et libérer le **TNFα soluble (sTNFα)**. Le TNFα peut se fixer sur deux types de récepteurs TNFR1 et TNFR2. La forme soluble du TNF α se fixe préférentiellement sur le TNFR1 qui est exprimé sur la majorité des types cellulaires et qui favorise l'apoptose. Alors que la forme **transmembranaire du TNFα (mTNFα) active plus spécifiquement TNFR2** (Grell et al., 1995).

Le TNFR2 est exprimé à la surface des cellules immunitaires. Il favorise contrairement au TNFR1 la **prolifération cellulaire (fig.25)**.

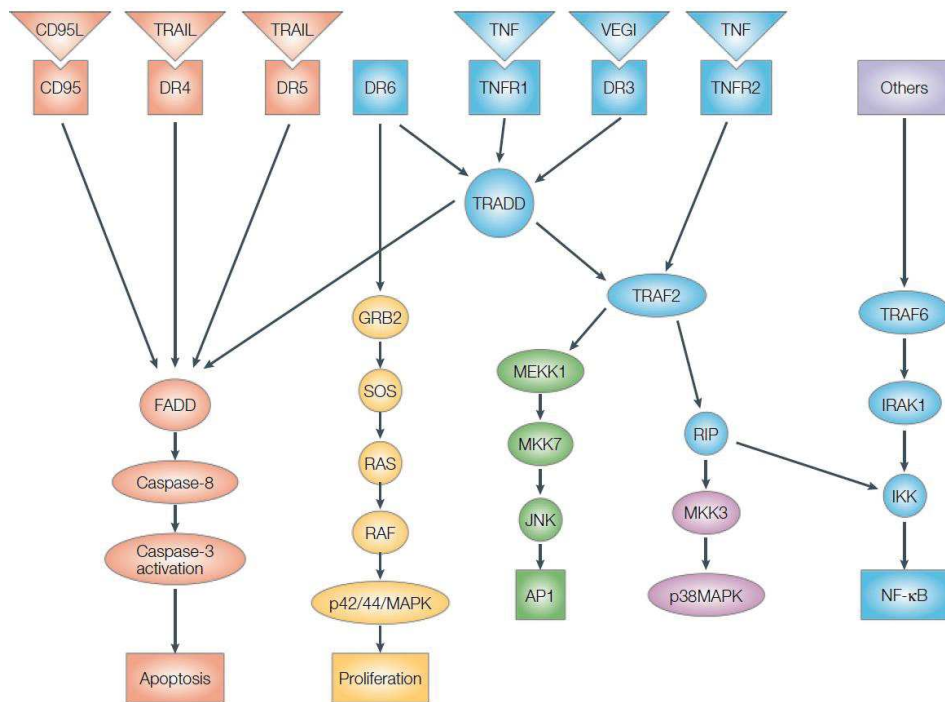


Figure 25 : Voie de signalisation intracellulaire du TNF α (Aggarwal, 2003)

b) Action du TNF- α sur son récepteur TNFR1

Lorsque le **sTNF α** se fixe à la partie extracellulaire du **TNFR1**, il peut induire la formation de complexes aux fonctions antinomiques. Le **complexe I** favorise l'expression de protéines aux propriétés anti-apoptotiques et favoriser la survie cellulaire. Il s'assemble suite à l'activation de la molécule **TRADD** (TNFR1-associated Death Domain), **RIPK1** (Hsu et al., 1995) et **TRAF2** (TNFR Associated fator2) qui induit l'activation de la voie principale de **NF κ B** (Fotin-Mleczek et al., 2002). L'activation de **RIPK1** puis du complexe **IKK composé de IKK α , IKK β et NEMO** (NF κ B Essential MOdulator) permet le maintien et la libération de NF κ B, sa translocation nucléaire et l'activation des **signaux de survie cellulaires** (Israël, 2010). **RIPK1 peut également activer la voie des MAPKK** qui phosphorylent elle-même **Junc (JNK)** favorisant ainsi la prolifération cellulaire et l'inflammation. Le **complexe II** est associé aux mécanismes d'**apoptoses**. RIPK1 qui est impliqué dans la formation du complexe I peut également en cas de diminution de son ubiquitination se détacher de la membrane s'associer à TRADD et FADD pour former le complexe Ila. Ce dernier libère la **caspase 8** et induit l'**apoptose** (Micheau and Tschopp, 2003).

c) Action du TNF- α sur les Treg TNFR2

Le **TNFR2** est exprimé par les lymphocytes, les cellules endothéliales et nerveuses, son activation est impliquée dans **la survie et la prolifération cellulaire**. Le mTNF α après sa trimérisation permet l'activation de TNFR2 par le recrutement de **TRAF2** (Rothe et al., 1995), puis l'activation de la voie **NF κ B et AP1 sans activation des domaines de mort contrairement à TNFR1** (Hauer et al., 2005). Le TNF α est à la fois un acteur majeur de la réponse pro inflammatoire et capable de réguler cette dernière en participant à **l'activation et la prolifération des Treg TNFR2** (Chen et al., 2007) (Chen and Oppenheim, 2010). Chez la souris, le TNFR2 est exprimé par 40% des Treg des tissus lymphoïdes et moins de 10% des Tconv (Chen et al., 2008) (Chen et al., 2010a). De plus le sous type des Treg CD4+FoxP3+TNFR2+ exprimant CD25+ a le plus fort pouvoir inhibiteur alors que les Treg TNFR2- même s'il exprime CD25 ne présentent qu'une activité immunosuppressive modérée chez la souris (Chen et al., 2007) comme chez l'homme (Chen et al., 2010b) (Yan et al., 2015).

Les **Treg TNFR2+ ont une forte capacité de prolifération en condition inflammatoire** (Baeyens et al., 2015). En absence de TNFR2 les Treg ne sont plus capables de contrôler la réponse inflammatoire (van Mierlo et al., 2008). Le marquage TNFR2 permet également d'identifier une population puissamment immunosuppressive parmi les Treg Foxp3+CD25-, expliquant que le tri des Treg CD4+TNFR2+ permette d'isoler une population quatre fois plus suppressive que le tri de Treg CD4+CD25+ (Chen et al., 2008)

Chez l'homme, TNFR2 est également exprimé par les Treg thymique et non pas par les Tconv (Annunziato et al., 2002). Parmi les lymphocytes FoxP3+ C25+ et CD25-, le niveau d'expression de TNFR2 reste plus intense que chez les Tconv CD4+Foxp3- (Chen et al., 2010b) (van Mierlo et al., 2008) (Nagar et al., 2010). En condition de réponse inflammatoire, la surexpression de TNFR2 chez les Treg est également associée à l'identification du sous type de Treg le plus immunosuppresseur, comme cela a été démontré au cours du paludisme (Minigo et al., 2009) ou au cours de la polyarthrite rhumatoïde (van Amelsfort et al., 2004) (Biton et al., 2011). Les Treg TNFR2 sont ceux qui expriment spontanément le niveau le plus élevé de **CTLA-4** (Wing et al., 2008).

IV. Objectifs du travail de thèse

Ce travail a pour objectif d'étudier le rôle des lymphocytes T régulateurs (CD4+FoxP3+) et particulièrement de ceux exprimant TNFR2 au cours de l'immunodépression précoce post-septique à *Staphylococcus aureus* dans un modèle murin original ainsi que d'évaluer leur implication au cours du choc septique chez l'homme.

Notre hypothèse de travail est que la réponse pro-inflammatoire initiale via l'expression du TNF α induit l'activation de la population lymphocytaire Treg et particulièrement celle exprimant le récepteur au TNF de type 2 (TNFR2). Les Treg TNFR2 activés pourraient contribuer à l'IS post-septique et constituer à la fois un marqueur diagnostique de l'IS et une cible thérapeutique avec l'utilisation d'anticorps bloquants anti-TNFR2.

Ce travail translationnel a fait l'objet de la création d'un **modèle murin d'IS post septique à *S. aureus***, d'un **article en cours de publication** présentant les résultats de la mise au point de notre modèle ainsi que l'étude du rôle des Treg TNFR2 au cours de l'IS post septique dans notre modèle et dans l'analyse d'une biocollection de patients pris en charge pour choc septique en réanimation.

Ce travail est organisé en 4 parties :

- **La création et la validation d'un modèle murin d'IS post-septique à *S. aureus***, nous ayant permis l'analyse des mécanismes précoces de mise en place de l'IS.
- **L'étude du rôle des lymphocytes Treg au cours de l'IS post septique sur notre modèle.**
- **L'étude du rôle du récepteur au TNF de type 2 (TNFR2) exprimé par les Treg au cours de l'IS post septique sur notre modèle.**
- **L'étude du rôle des lymphocytes Treg TNFR2 chez l'homme au cours du choc septique.**

V. Résultats

1. Mise en place d'un modèle murin innovant d'IS induit par le sepsis à *S. aureus*

a) Introduction

Le sepsis débute par un syndrome de réponse inflammatoire systémique intense, la majorité des patients qui survivent à cette phase précoce développeront une réponse anti-inflammatoire compensatoire soutenue qui peut conduire à un état d'immunosuppression prolongé pouvant durer des années (Otto et al., 2011). Ces altérations immunitaires diminuent la capacité d'éradiquer l'infection primaire et augmentent le risque d'infections secondaires. Une question demeure : pourquoi l'immunosuppression persiste-t-elle pendant et après le sepsis sévère ?

Le principal modèle murin utilisé pour l'études de l'IS post septique est le modèle de péritonite par ponction caecale (Shindo et al., 2017a) (Chang et al., 2013a). Ce modèle est validé en terme d'IS par la mise en évidence d'une lymphopénie et d'une augmentation de la susceptibilité à une seconde infection dans la suite du premier épisode de sepsis, également appelé modèle « double Hit ». Ce modèle présente comme avantage d'être proche des conditions de la péritonite chez l'homme. Cependant, Il ne s'agit pas d'un sepsis isolé, mais avant tout d'un modèle de péritonite induit par une procédure opératoire complexe (Zhu et al., 2013). Ce modèle induit une forte létalité, nécessitant le recours à une antibiothérapie dont les effets sur l'immunité ne sont pas évalués. Enfin, ce modèle de sepsis par translocation digestive n'est pas spécifique d'un pathogène, la flore digestive des souris pouvant varier selon le site de la ponction digestive (jéjunale ou colique), et d'une souris à l'autre (d'un laboratoire à l'autre également).

Les autres modèles utilisés présentent également des limites (Deitch, 2005) (Lewis et al., 2018). Le modèle « aseptique » d'induction d'une réponse inflammatoire au LPS (De Wilde et al., 2009), permet l'étude des mécanismes d'activation et d'inhibition immuns, mais reste peu superposable aux réalités cliniques. Les modèles d'uro-sepsis et de pneumopathies présentent des spécificités physiopathologiques les rendant non généralisables à l'ensemble des sepsis.

Le sepsis fait partie des premières causes de mortalité dans les unités de soins intensifs. Parmi elle, les infections associées au plus haut risque de mortalité sont respiratoires (22%) et dans 33% des cas associées à une bactériémie (Mayr et al., 2010). Les germes les plus souvent en cause tous sites confondus sont les bactéries à Gram négatif (62%) et les cocci à Gram positif (46,8%). Au premier rang des infections à cocci Gram positif, le *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est le plus souvent retrouvé (20,5%) et associé à la mortalité la plus élevée (Mayr et al., 2014).

Nous avons donc développé un nouveau modèle de sepsis à *S. aureus* qui est une bactérie fréquemment rencontrée en clinique humaine. Ce modèle présente une faible létalité, une excellente reproductibilité et une plus grande spécificité que les modèles déjà connus. Nous éprouverons le niveau d'immunosuppression induite par le premier HIT (bactériémie à *S. aureus*) et par un second HIT (pneumopathie à *P. aeruginosa*), dans le but de s'approcher au maximum des observations et préoccupations en clinique humaine.

b) Matériel et méthodes

Souris et souches bactériennes utilisées

L'ensemble des souris utilisées étaient âgées de 6 à 12 semaines. Les souris RjOrl:SWISS et C57BL/6NRj utilisées sont issus d'un élevage des laboratoires Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Les souris C57BL/6-Tg (Foxp3-DTR/EGFP)23.2Spar/Mmjax (Lahl et al., 2007. Later named DEREG) sont issus du laboratoire Charles River (Saint Germain Nuelles, France). Les souris B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J (later named OT-II) (Barnden et al., 1998) ont été générées par croisement OT-II (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn/CrI), Ly5.1 (B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyCrI) et de souris reporter Foxp3EGFP. Les souris OTII et Ly5.1 sont issue des laboratoire Charles Rivers (France). Les souris reporter Foxp3EGFP (Wang 2008 PMID: 18209052) ont été fournies par Bernard Malissen et Cédric Louvet (UMR 1064, Pr Regis Josien) et les Souris C57BL/6 Tnfrsf1btm1Mwm (appelées par la suite TNFR2-/-) par le Dr Benoit Salomon (UPMC UMRS CR7 - Inserm U1135).

Toutes les expériences ont été conduites en accord avec les principes de soins des animaux de laboratoires et en accord avec les recommandations d'éthique animale en vigueur, et après dépôt d'une saisine au comité d'éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire, université d'Angers, C2EA-06 (protocole n°2126-2130).

Les souches de *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) et de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) sont obtenus après culture en milieu BCC (bouillon cœur cerveau), dilution dans du sérum physiologique, puis détermination de leurs concentrations par mesure néphélométrique (densité optique). Nous réalisons à chaque étape un contrôle par inoculation sur milieu adapté (Trypticase Soja (TS) ou milieu Chapman pour *P. aeruginosa* et *S. aureus* respectivement) et dénombrement bactérien.

Protocoles expérimentaux sur modèle murin

Induction du sepsis à *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) et de la pneumonie secondaire par *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) : Après anesthésie générale par inhalation d'isoflurane (3% débit de gaz frais 0.8L/min), la souris est placée en décubitus ventral. Nous réalisons une injection dans le plexus

veineux sous-orbitaire de 200µL d'une suspension bactérienne permettant d'induire une septicémie. Les souris infectées seront comparées à des souris « contrôles » ne recevant qu'une solution d'eau physiologique (souris sepsis-). Les pneumopathies étaient réalisées par une instillation endotrachéale (cathétérisation directe endotrachéale par sonde de 24 gauge) de 75uL de notre inoculum bactérien afin d'induire une pneumopathie (Broquet et al., 2014).

Induction de la prolifération des cellules OTII après transfert adoptif

Les lymphocytes TCD4 « OT-II » ont été purifiés à partir des ganglions lymphatiques (inguinaux, axillaires, sacrés, cervicaux et mésentériques) et de la rate de souris OT-II. Après lyse des globules rouges et enrichissement CD4 + (Miltenyi Biotec, Allemagne). Après control par cytométrie de flux, la pureté des préparations de lymphocytes T CD4 OTII était de à 85 %-95 %.

Afin d'évaluer les capacités de présentation de l'antigène dans la rate, des souris ont été injectées par voie i.v. avec des cellules OT-II ($0,5 - 1,5 \times 10^6$ cellules) associées à une solution d'OVA (0,1 mg, A5503, Sigma-Aldrich, France). Cinq jours plus tard, les animaux sont sacrifiés et les splénocytes sont marqués avec des anticorps anti-CD4, CD45.1, anti-TCRVα2, avec des billes de comptage (Becton Dickinson). Le nombre total de cellules vivantes OT-II est ainsi calculé à partir du nombre de cellules OT-II par rapport au nombre de billes présentes dans chaque échantillon. Les souris témoins recevaient des cellules OTII avec PBS seul (sans OVA).

Analyses des prélèvements murins

- **Analyses bactériologiques**

La quantification était réalisée par cultures des broyats des poumons et des rates après pesée des organes et homogénéisation mécanique par broyage à bille. La quantification des charges bactériennes est réalisée par comptage du nombre d'UFC (Unité Formant Colonie), après dilutions au 1/100ème des homogénats, culture à 37°C sur des géloses TS et sur géloses spécifiques du *S. aureus* (Roquilly et al., 2010). Après 24 à 48H d'incubation, les colonies sont dénombrées. Les résultats ont été exprimés en Log10 UFC par gramme d'organe.

- **Analyses histologiques**

A 24 h de l'infection pour les pneumopathies, les groupes de souris sont euthanasiés et l'ensemble des poumons sont prélevés et fixés dans du formol à 4%. Des colorations Hématoxyline Phloxine et Safran (HPS) sont réalisées, ainsi que des colorations immunohistochimiques spécifiques anti-Ly6-G (marqueur des polynucléaires neutrophiles). Les coupes histologiques sont entièrement numérisées à l'aide d'un scanner de lames (Hamamatsu) et les images obtenues sont analysées à l'aide du logiciel

open source Fiji. La méthodologie SIOX (Single Integrative Object eXtraction), consistant en l'analyse des coupes histologiques numérisées, nous permet ensuite l'extraction de l'intensité et l'étendue de marquages spécifiques (anticorps marqué notamment). Ainsi, l'analyse SIOX permet d'appréhender les modifications sur l'afflux neutrophilique et l'évaluation de l'oedème dans notre étude.

- **Détermination par méthode ELISA du niveau d'expression cytokinique pulmonaire splénique**

Après prélèvement des organes (poumons et rates), les échantillons sont immédiatement homogénéisés mécaniquement à 4°C, en présence de tampon de lyse (1× PBS, pH 7.4 / 0.1% Triton X-100) contenant 1 mM de protéase inhibiteur cocktail (Sigma, L'Isle D'Abeau Chesnes, France). Nous quantifions ensuite le contenu cytokinique des surnageants pour le Tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukine (IL)-1 β , interleukine (IL)-10, interleukine (IL)-12, par méthode ELISA en suivant les recommandations constructeur (eBioscience). La concentration protéique de chaque échantillon est déterminée en utilisant le kit de dosage protéique BCATM protein assay kit (ThermoFisher, Courtabeuf, France).

- **Analyse par cytométrie en flux**

Après euthanasie des souris, les rates sont prélevées et disséquées mécaniquement par passage au tamis (pores de 100 μ m). Après la lyse des globules rouges, les splénocytes sont mises en suspension dans une solution tampon (PBS EDTA 0,1% BSA 0,5%) et centrifugation (1500 rpm, 10 min à température ambiante). Les suspensions cellulaires ainsi obtenues sont incubées 30 min avec les anticorps couplés aux fluorochromes spécifiques. Pour les marquages intracellulaires et intranucléaires, les cellules ont été fixées et perméabilisées (cytofix/cytoperm BD, BD Bioscience).

Les anticorps monoclonaux conjugués suivants ont été utilisés : anti-CD3 (145-2C11, BD Bioscience), anti-CD4 (RM4-5, BD Pharmingen), anti-CD25 (PC61, BD Horizon), anti-CD62L (MEL-14 ; BD Horizon), anti-TNFR2 (TR75-89, BD Pharmingen), anti-CD45.1 (A20.1 ; eBioscience), anti-Latency Associated Protein/TGF β 1 (TW7-16B4, eBioscience), anti-TCR V α D (B20.1 ; BD Bioscience), anti-FoxP3 (MF14, Biolegend), anti-CTLA4 (UV10-4B9, Biolegend), colorant à viabilité fixe (eBioscience). Des échantillons ont été acquis sur LSR-II (Becton Dickinson) et analysés avec Flowjo Software (TreeStar Inc, Ashland, OR).

Analyse RNA sequencing

Pour l'analyse RNAseq, les Treg (CD4⁺ FoxP^{GFP+}) et Treg TNFR2 +/- ont été obtenus après tri par FACS Aria III avec une pureté supérieure à 90%, après phase d'enrichissement CD4⁺ (sélection négative par kit milteni), à partir d'un ensemble de rate de souris en condition de sepsis ou non infectées (2 rates

poolés par échantillon pour l'analyse Treg sepsis et 3 rates poolées pour les analyses Treg TNFR2+ et TNFR2-au cours du sepsis).

L'ARN a ensuite été extrait (NucleoSpin RNA Plus XS, MACHEREY-NAGEL (Valencia, CA). L'analyse par séquençage a été réalisée par laboratoire Plateforme Génomique de l'institut de Biologie – génomique Paris centre – Institut de Biologie de l'école normale supérieure (IBENS) de l'Ecole Normale Supérieure.

Déplétion des lymphocytes Treg chez les souris DERE

Pour obtenir une déplétion en lymphocytes Treg, de la toxine diphtérique (0,5 µg injectés en intrapéritonéale pour la première injection, puis 0,2 µg i.p, puis tous les 3 jours - Sigma-Aldrich, France) a été administrée à des souris FoxP3GFP-DTR (DEREG) (Charles River). La première injection de DT a été effectuée après l'induction de la septicémie et tous les trois jours avant le transfert adoptif des cellules OTII. L'efficacité de la déplétion Treg (nombre de cellules) a été contrôlée au cours des expériences (> 90%).

Utilisation des anticorps monoclonaux anti-TNFR2

L'anticorps anti-TNFR2 (RM134L, isotype Rat IgG2b, κ) a été administré par voie intraveineuse 15 minutes avant l'induction du sepsis, puis 15 minutes avant le transfert des lymphocytes T OT-II associé à la suspension d'OVALBUMIN ou avant l'induction de la pneumonie secondaire.

Cohorte clinique et biocollection d'échantillons cliniques

Pour ce travail nous avons utilisé des prélèvements issus de la biocollection IBIS-sepsis (severe septic patients), Nantes. Dans cette cohorte les patients ont été recrutés de janvier 2014 à décembre 2018 dans l'unité de soins intensifs chirurgicaux du CHU de Nantes (France). Les prélèvements d'échantillons humains attachés à cette cohorte ont été déclarés au Ministère de la Santé (DC-2011-1399). Le consentement éclairé écrit d'un proche était requis pour l'inclusion et dans la mesure du possible, le consentement rétrospectif des patients a été obtenu. Les critères d'inclusion étaient tout patients âgés de plus de 18 ans admis dans le service de Réanimation Chirurgicale du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes (CHU) pour choc septique, avec une durée de séjour en réanimation d'au moins 48 heures, et une durée d'intubation d'au moins 24 heures suivant l'admission en réanimation. Le choc septique était défini par la coexistence des critères internationaux (Singer et al., 2016b) suivants : une infection suspectée ou documentée, des critères de sepsis (score SOFA ≥ 2 ou augmenté de 2 points), la nécessité de vasopresseurs pour maintenir la PAM ≥ 65 mmHg, des lactates plasmatiques > 2 mmol/L. Les femmes enceintes, les patients traités par immunosuppresseurs, les patients ayant un antécédent de maladie auto-immune et les patients ayant une espérance de vie inférieure à 24 heures à

l'admission en réanimation étaient exclus. Trois prélèvements sanguins étaient réalisés : le premier dans les 48 premières heures (prélèvement appelé J1), le deuxième au quatrième jour (J4) et le troisième au septième jour (J7). Les prélèvements étaient immédiatement transmis au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nantes, pour extraction des PBMC par gradient de densité. Les PBMC étaient par la suite congelés à -160°C dans du plasma autologue + 10% de diméthylsulfoxyde. Les échantillons de PBMC provenant de volontaires sains (donneurs de sang à l'Etablissement Français du Sang) congelés dans du tampon phosphate + 10% de diméthylsulfoxyde + 4% d'Albumine humaine à -160°C au Centre de Ressources Biologiques ont été utilisés comme population témoin.

Analyse des PBMC humains

Après suspension dans une solution tampon (PBS EDTA 0,1% BSA 0,5%) et centrifugation (1500 tr/min, 10 min à température ambiante), le culot de cellule a été mis en suspension dans du PBS et des anticorps marqués puis analysés au cytomètre en flux FACS. Les cellules Treg ont été identifiées par un marquage : CD4-PerCP, CD25-PeCy7, CD127-APC cy7, TNFR2-FITC, CTLA4-PE et Foxp3-APC. Les Treg ont été identifiés comme étant CD4+CD25^{HI}CD127^{lo}/-Foxp3+.

Stimulation des PBMC

Les cellules mononuclées du sang circulant (PBMC) de donneurs sains sont issues de prélèvements sanguins qui ont été fournis par l'Etablissement Français du sang (Nantes, France). Après centrifugation du sang sur gradient de ficol, les PBMC ont été conservées dans l'azote jusqu'à réalisation de l'analyse dans une solution de DMSO à 10%. Après 2 heures de co-culture, de 1×10^6 cellules de PBMC avec une suspension de *S. aureus* (MOI de 1/1), un traitement par gentamycine est ajouté pendant 20 min. Après remise en suspension dans une solution tampon (PBS EDTA 0.1% BSA 0.5%) et centrifugation (1500 rpm, 10 min), les cellules sont gardées en suspension en présence d'IL-2 (100 UI/ml) pendant 48 heures avant analyse au cytomètre en flux.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, United States). Les variables continues non paramétriques ont été exprimées en médiane (25-75ème percentile) et analysées par un test de Kruskal-Wallis avec utilisation post-hoc du test de Dunns. Les analyses des populations en pourcentage ont été réalisées par un test de Fisher bilatéral.

2. L'IS post sepsis est associée à une plus grande susceptibilité aux pneumopathies secondaires

a) Création d'un modèle de sepsis à *S. aureus*

Le sepsis est défini par une réponse dérégulée de l'hôte à une infection responsable de dysfonctions d'organes secondaires (Shankar-Hari et al., 2016). Il peut se compliquer d'une IS prédisposant aux infections secondaires dans les services de soins intensifs. Ces infections secondaires sont le plus souvent des pneumopathies (Hotchkiss et al., 2013b).

Pour approcher des conditions cliniques dans un modèle murin, nous avons reproduit le scénario d'un sepsis bactériémique, suivi d'une pneumopathie afin de rechercher l'apparition d'une IS. Nous avons induit un sepsis à *staphylococcus aureus* par injection intraveineuse directe d'un inoculum cible bactérien, définissant notre modèle de sepsis. Puis secondairement, nous avons induit une pneumopathie à *pseudomonas aeruginosa* par instillation directe endotrachéale d'un inoculum non létal (Fig.26).

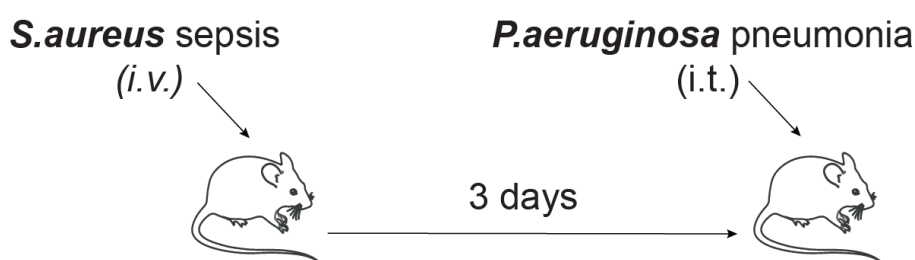


Figure 26 : Modèle d'IS post septique. Schéma de la procédure expérimentale du modèle d'IS induit par le sepsis à *S. aureus* (intra-veineux), suivi d'une pneumopathie à *P. aeruginosa* (intra-trachéale) au 3^{ème} jour du sepsis.

Nous avons déterminé un inoculum pour le sepsis à *S. aureus* responsable de signes cliniques de sepsis (poils hérissés, modification de comportement, perte de poids). L'étude de la survie de trois groupes au cours du temps, nous a permis de déterminer, un taux de décès de 50% à 48h pour un inoculum de 4.10^7 UFC/souris et de moins de 5% (sans différence significative) pour 4.10^6 et 4.10^5 UFC/souris. L'inoculum d'intérêt que nous nous sommes fixés est donc de **4.10^6 UFC/souris (Fig.27)**.

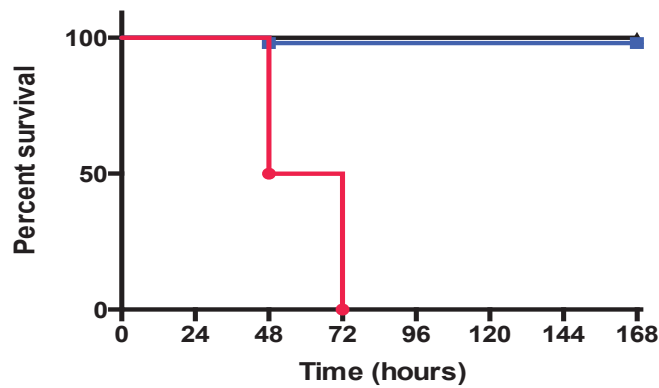


Figure 27 : Détermination de l'inoculum de *S. aureus*. Courbes de survie des souris à différents inoculi de *S. aureus* (rouge 4.10⁷ UFC/souris, bleu 4.10⁶ /souris, noir 4.10⁵ UFC/souris), (n= 8 par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

Nous avons ensuite analysé la dissémination bactérienne splénique et pulmonaire du *S. aureus* dans notre modèle de sepsis. Du second au 4^{ème} jours du sepsis, les charges bactériennes étaient mesurées en moyenne à 3,63 log UFC/g d'organe (IC95%, 3-4,3) et associée à la persistance des signes cliniques de sepsis (Fig.28).

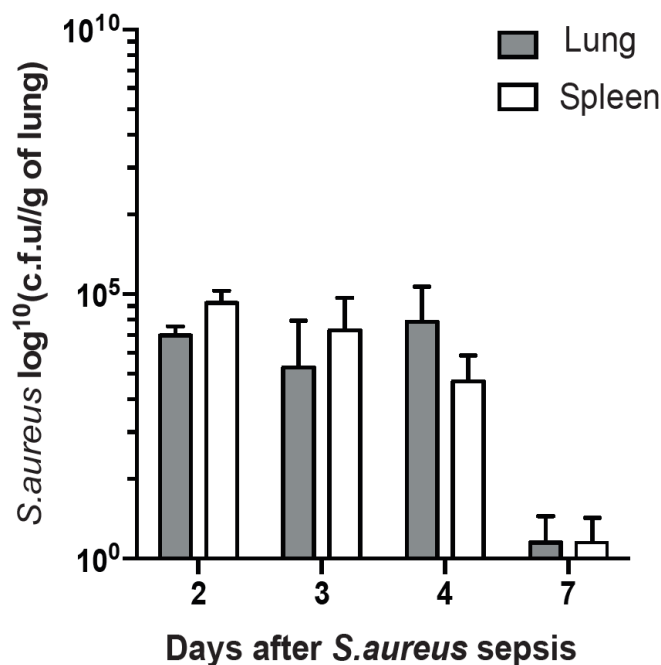


Figure 28 : Sepsis à *S. aureus* caractérisé par une bactériémie. Charges bactériennes pulmonaires et spléniques à *S. aureus* en colony-forming units (CFU) par gramme de poumon (CFU/g) ou de rate (CFU/g) en fonction du temps après l'induction du sepsis (n = 4 par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes)

Cette bactériémie était associée à une réponse pro-inflammatoire systémique caractéristique du sepsis (Delano and Ward, 2016) (Shankar-Hari et al., 2016). Celle-ci est observée dans notre modèle par l'expression de **CD86 par les cellules dendritiques spléniques** (Nk1.1 -, CD3-, B220-, CD24+ CMHII +, CD11c+) et de **CD69 par les lymphocytes T CD4** spléniques (CD3+, CD4+) et s'accompagne d'une splénomégalie significative (**Fig.29**).

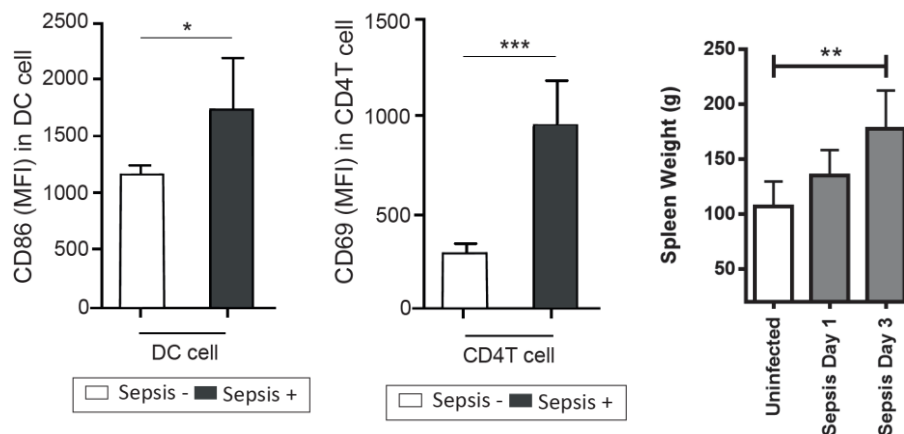


Figure 29 : Activation lymphocytaire et des cellules dendritiques au cours du sepsis. Expression membranaire de CD86 parmi les cellules dendritiques (DC) (histogramme de gauche), du CD69 parmi les lymphocytes CD3+CD4+ (histogramme du centre) au 1^{er} jour du sepsis (sepsis+) en comparaison des souris non infectées (sepsis-). Evolution du poids des rates des souris au premier et 3^{ème} jour du sepsis en comparaison des souris non infectées (histogramme de droite) (n= 5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, (Mann-Whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Les taux de cytokines pro-inflammatoires spléniques, **TNFα et l'IL1-β** étaient également augmentées dès les 1^{er} heures du sepsis (**fig.30**).

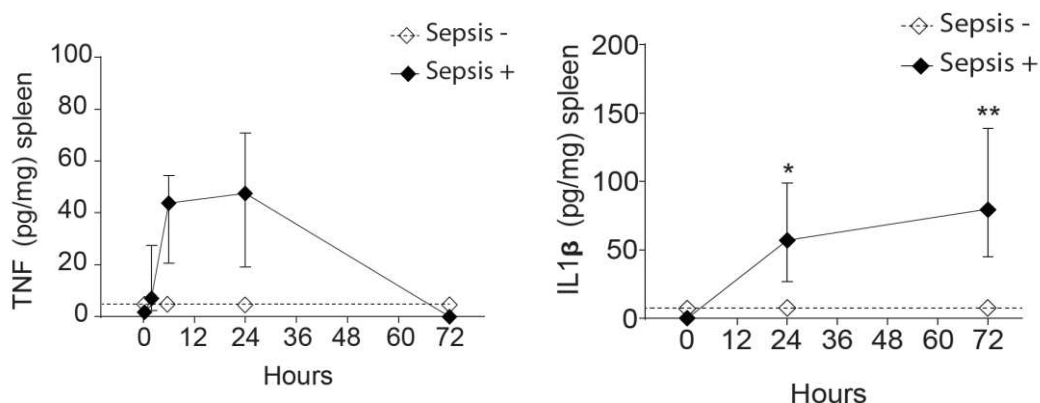


Figure 30 : Réponse pro-inflammatoire systémique induite par le sepsis. Concentrations de TNFα mesurées par méthode ELISA dans les rates des souris à 6, 12, 24 et 72 heures du sepsis(sepsis+), en comparaison de souris non infectées (sepsis-) (histogramme de gauche). Concentrations d'IL-β mesurées par méthode ELISA dans les rates des souris à 24 et 72 heures du sepsis (sepsis+) en comparaison de souris non infectées (sepsis-) (n= 4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, (Mann-Whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

En analyse histologique, cette inflammation s'accompagne d'une infiltration pulmonaire tissulaire marquée (**Fig.31**) suggérant une dysfonction pulmonaire secondaire au sepsis.

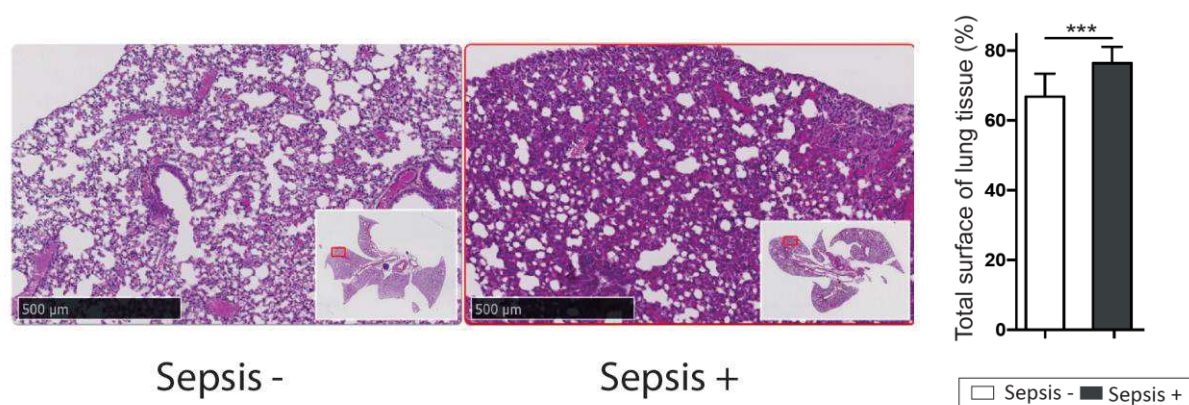


Figure 31 : Œdème lésionnel induit par le sepsis. Coupes histologiques de poumons (coloration Hématoxyline et éosine, H&E) de souris non infectées (sepsis -) (image de gauche), en comparaison de souris infectées après 3 jours du sepsis (sepsis+) (image du centre) (grossissement X20, échelle = 500 µm). Analyse de la surface tissulaire (analyse SIOX) à partir de souris non infectées et souris au 3^{ème} jour du sepsis (n= 5 par groupes, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de exact fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

b) Induction d'une immunodépression post septique au 3^{ème} jour du sepsis à *staphylocoque aureus*

Pour évaluer l'impact du sepsis *staphylococcus aureus* sur les défenses immunitaires de notre modèle, nous avons induit une pneumopathie à *pseudomonas aeruginosa* à la suite du sepsis, modèle aussi appelé « **double hit** ».

Nous avons observé une aggravation de la sévérité de l'infection pulmonaire chez les souris septique à *S. aureus* en comparaison des souris soumise à une pneumopathie seule. L'aggravation de la pneumopathie secondaire était caractérisée par une augmentation de **la perte de poids** jusqu'au 6 jours de la pneumopathie dans le groupe des souris du « double HIT » (Sepsis + pneumopathie au 3^{ème} jour du sepsis). Cette perte de poids est en médiane de 31% du poids initial. Elle est plus intense et prolongée que celle induite par le sepsis seul (6.16% du poids initiale) ou la pneumopathie seule (6.75% du poids initiale) (**Fig.32**). La perte de poids après « double hit » est plus de 2 fois supérieure à l'addition des pertes de poids liées au sepsis seul (6.16%) et à la pneumopathie seule (6.75%) ce qui suggère fortement un effet potentialisateur du sepsis sur la perte de poids des animaux. Cette augmentation de la susceptibilité à l'infection secondaire dès le 3^{ème} jour du sepsis nous a conduit à rechercher l'induction d'une IS post septique au niveau systémique et pulmonaire dans notre modèle.

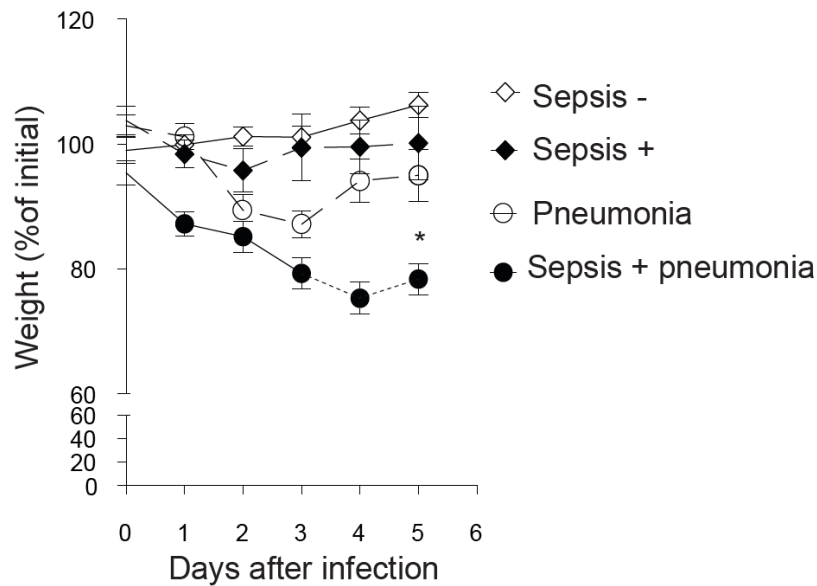


Figure 32 : La pneumopathie secondaire au sepsis s'accompagne d'une plus grande sévérité clinique qu'une pneumopathie seule. Poids des souris infectées par une pneumopathie à *P. aeruginosa* seule (n=9) en comparaison d'une pneumopathie à J3 du sepsis à *S. aureus* (n=11), d'un sepsis seul à *S. aureus* et de souris non infectées (n=8).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de exact fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

Nous avons analysé la réponse immunitaire pulmonaire induite par la pneumopathie dans ces différents groupes. Nous avons observé une diminution des marqueurs de la réponse pro-inflammatoire pulmonaire (**TNF- α** , **l'IL-1 β** et **l'IL-12**) en réponse à la pneumopathie dans le groupe des souris où la pneumopathie était induite au 3^{ème} jour du sepsis, en comparaison de la pneumopathie seule (**Fig.33**). Nous avons également observé de manière concomitante une baisse des capacités de recrutement des **polynucléaires neutrophiles** à 24 h de la pneumopathie en comparaison de la pneumopathie seule (**Fig.34**).

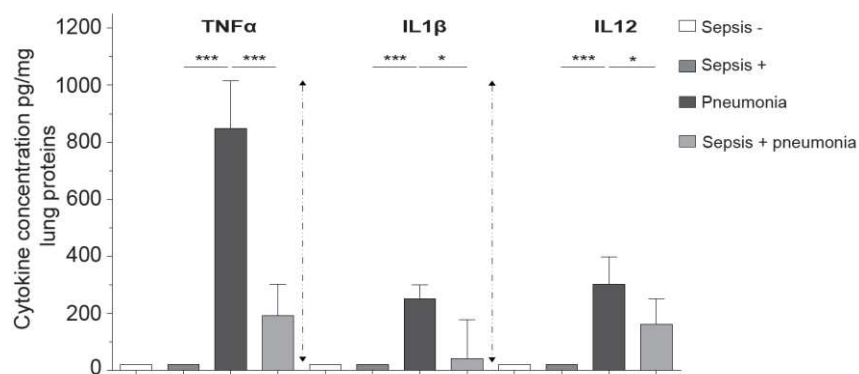


Figure 33 : Baisse de la réponse pro-inflammatoire au cours de la pneumopathie secondaire en comparaison d'une pneumopathie seule. Taux de cytokines pulmonaires mesurés par méthode ELISA (TNF α à H6, d'IL1- β à H24 et d'IL-12 à H6) de la pneumopathie seule (pneumoniae) ou après le 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+pneumonia) en comparaison des souris après un sepsis seul (sepsis+) et de souris non infectées (sepsis-) (n= 4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (Mann-Whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

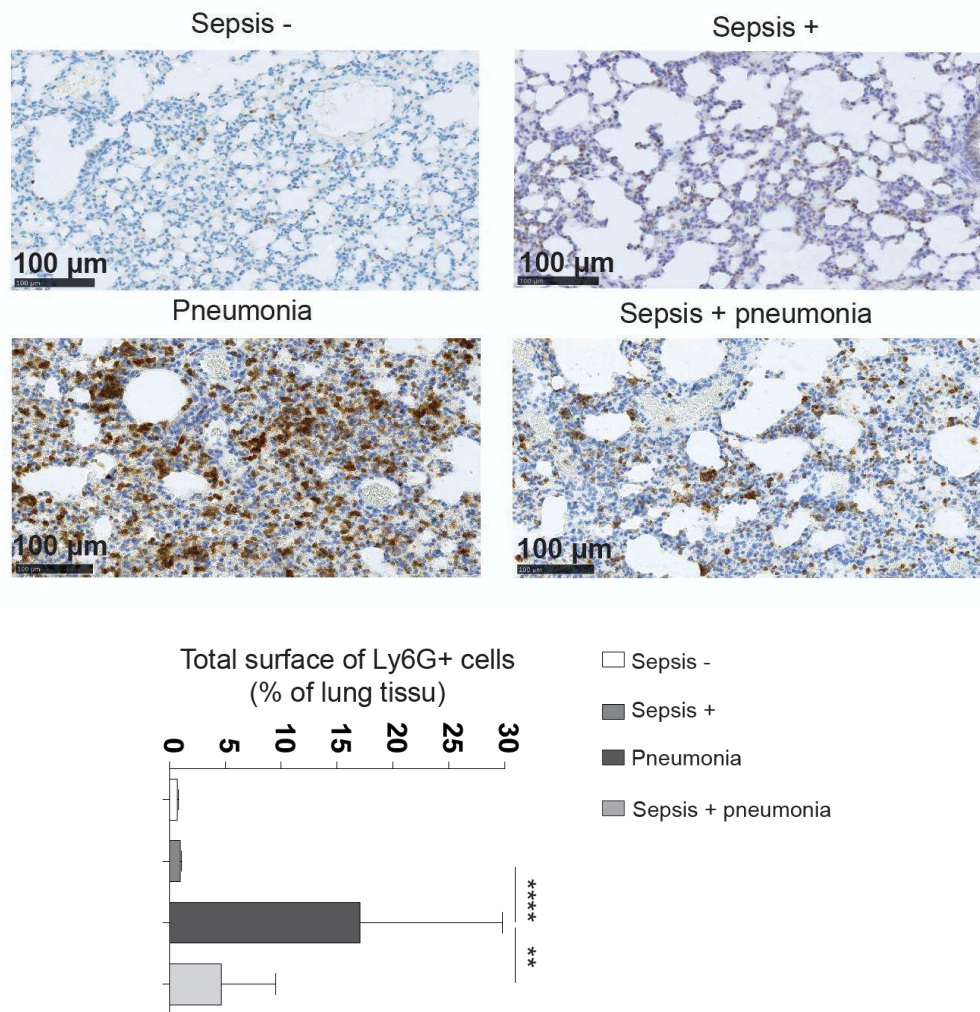


Figure 34 : Baisse de la réponse neutrophilique au cours de la pneumopathie secondaire en comparaison d'une pneumopathie seule. Analyse des coupes histologiques pulmonaires de souris avec marquage immunohistochimique par anticorps anti-Ly6-G réalisées à 24h d'une pneumopathie à *P. aeruginosa* seule (pneumonia), en comparaison de souris à 24h de la pneumopathie au 3^{ème} jours du sepsis (sepsis+pneumonia) et de souris au 3^{ème} jour du sepsis seul (sepsis+) et de souris non infectées (sepsis-) (grossissement X20, échelle = 100 µm). Histogramme représentant la quantification par analyse SIOX de l'infiltrat en polynucléaires neutrophiles dans les groupes correspondants. (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (Mann-Whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Ces résultats suggèrent l'induction d'un **phénomène d'IS post septique systémique débutant dès le 3^{ème} jour du sepsis à *staphylocoque aureus*.**

Cette IS ne s'accompagne pas d'une augmentation des charges bactériennes pulmonaires à 24 heures de la pneumopathie à *pseudomonas aeruginosa* (**Fig.35**). La plus grande susceptibilité des souris à une seconde infection ne semble pas impliquée une prolifération précoce bactérienne, mais plutôt des troubles dysimmunitaire secondaires.

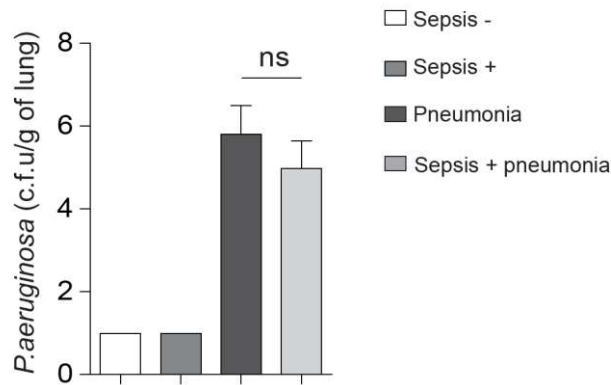


Figure 35 : Absence d'impact de l'IS sur les charges bactériennes pulmonaires précoce au décours de la pneumopathie. Mesure des charges bactériennes pulmonaires (*P. aeruginosa*) à 24h de la pneumopathie seule (pneumonia) et après le 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+pneumonia) en comparaison des souris au 3^{ème} jour du sepsis à *S. aureus* (sepsis+) et des souris non infectées (sepsis-). (Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes). (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

ns: différence non significative, (Mann-Whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Pour explorer l'atteinte du compartiment lymphocytaire T dans notre modèle, nous avons analysé l'expression de la « program-death 1 protein » PD1 sur les lymphocytes T effecteurs spléniques (CD4+Foxp3-) dans les mêmes conditions expérimentales. Nous avons observé une augmentation d'expression de PD1 sur les lymphocytes (CD4+FoxP3-) chez les souris du groupe double Hit (sepsis+ pneumopathie) en comparaison du groupe pneumopathie seule ou sepsis seul (**Fig.36**).

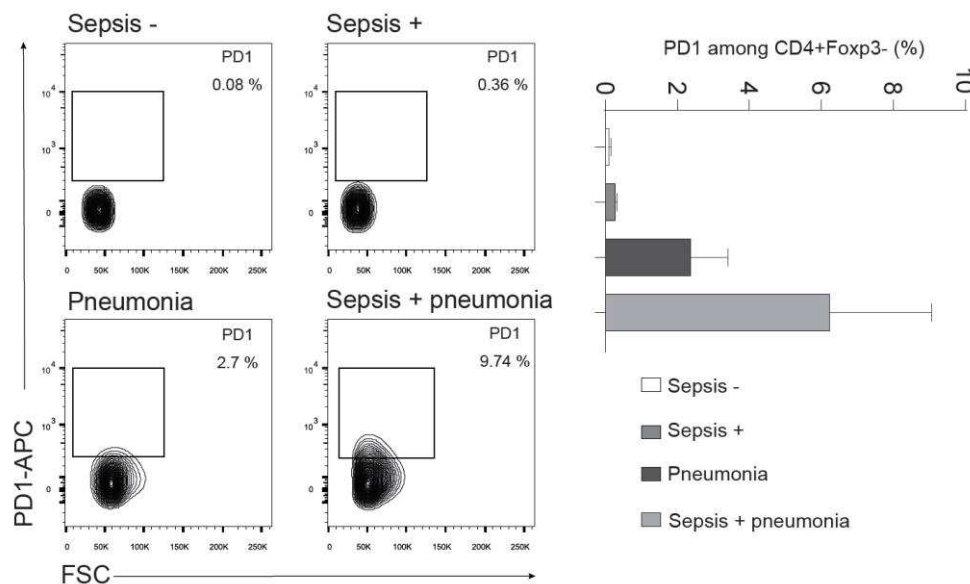


Figure 36 : L'IS dans notre modèle est associée à un phénomène d'épuisement lymphocytaire induit par le sepsis. Expression du niveau d'expression membranaire de la program-death 1 protein sur les lymphocytes (CD3+CD4+FoxP3GFP-) spléniques, 24 h après la pneumopathie seule à *P. aeruginosa* (pneumonia), ou au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+pneumonia) en comparaison de souris au 3^{ème} jour du sepsis seul (sepsis+) ou de souris non infectées (sepsis-). Histogramme (panel de droite) représentant le pourcentage de splénocytes CD3+CD4+FoxP3-PD1+ parmi les CD3+CD4+ dans les groupes correspondants. (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes). *p < 0.05, **p < 0.01, *p < 0.01, (test exact fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

c) Anergie lymphocytaire T CD4+

Pour analyser *in vivo* les fonctions lymphocytaires T CD4+ effectrices dans notre modèle de sepsis, nous avons utilisé des souris transgéniques « OTII CD45.1 FoxP3^{GFP} » exprimant un TCR spécifique de l'ovalbumine à la surface des lymphocytes CD4+ (ainsi qu'un reporter GFP sur le promoteur du gène FoxP3). Chez ces souris, la présentation par les CPA d'antigènes peptidiques issus de l'ovalbumine (OVA) par le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII) permet d'induire la prolifération clonale des lymphocytes T CD4+. Le transfert adoptif de lymphocytes T CD4 spléniques de souris OTII (CD4+CD45.1 TCRV α 2+), associé à une suspension d'ovalbumine dans une souris CD45.2 permet donc d'évaluer les capacités fonctionnelles de présentation antigénique et de prolifération lymphocytaire T *in vivo* par quantification du nombre OTII (CD45.1) splénique 7 jours après leur transfert.

Nous avons observé une profonde diminution des capacités de prolifération des cellules OTII après leur transfert (associé à une suspension d'ovalbumine) au 3^{ème} jour du sepsis en comparaison de souris non septiques (**Fig.37**).

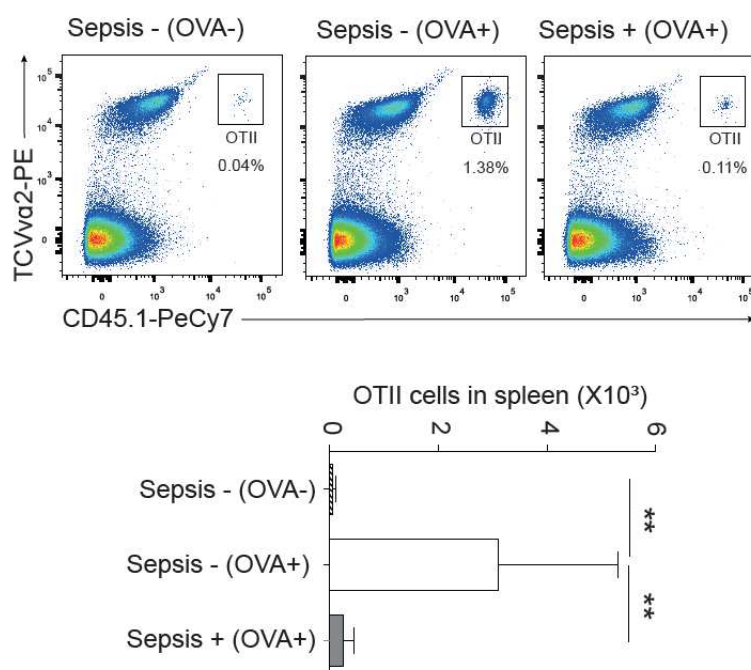


Figure 37 : L'IS post septique est associée à une baisse des capacités d'activation et de prolifération lymphocytaire T *in vivo*. Analyses de splénocytes au 5^{ème} jour après le transfert adoptif de cellules CD4+CD45.1 OTII injectées avec une suspension d'Ovalbumine (OVA) en intra-veineux à des souris CD45.2 au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis OVA+) ou non infectées (sepsis-OVA-), en comparaison de cellules OTII infectées sans Ovalbumine (sepsis-OVA-). Histogramme (panel de bas) représentant le nombre de splénocytes CD4+CD45.1 TCR α 2+ dans les groupes correspondants. (n=5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes).

*p < 0.05, **p < 0.01, *p < 0.01, (test de Mann-whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Conclusion de la partie 1 :

L'ensemble de ces expériences nous a permis de valider un modèle original d'immunodépression précoce induite par le sepsis à staphylocoque aureus, se rapprochant de conditions cliniques humaines. Cette IS post septique implique une altération profonde des capacités de réponses de l'immunité innée et adaptative et s'accompagne d'une augmentation de la susceptibilité aux infections secondaires.

2. Rôle des lymphocytes T régulateur au cours de l'IS post septique sur le modèle murin de sepsis à *S. aureus*

1. Introduction

Les lymphocytes Treg par leurs puissantes capacités immunosuppressives sont de bons candidats pour expliquer, au moins en partie, l'atteinte du compartiment lymphocytaire T CD4 au cours de l'IS post septique.

L'activation des lymphocytes Treg , s'accompagne de l'expression de molécules inhibitrices comme CD152 (CTLA4) (Qureshi et al., 2011), l'IL-10 (Ito et al., 2008) et LAG-3 capable d'inhiber les lymphocytes T CD4 effecteurs. Ils peuvent également induire l'apoptose des lymphocytes T CD4 effecteurs par plusieurs mécanismes d'action, la privation d'IL-2 secondaire à leur expression de CD25, l'hypercatabolisme du tryptophane induit par l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygense (IDO) et du CTLA4 (Cobbold, 2009). L'expression de granzyme (B et A) (Gondek et al., 2005) (Cao et al., 2007), de la voie Fas/FasL (Venet et al., 2006), de TGF- β (Bettelli et al., 2006) et l'IL-10 par les Treg activés favorise également l'apoptose des lymphocytes T en contexte inflammatoire.

Les Treg sont donc des acteurs de l'immunité adaptative essentiels au maintien de l'homéostasie et de la tolérance périphérique, cependant on ne sait que peu de choses concernant leurs rôles au cours de l'immunosuppression induite par le sepsis et leurs implications dans les mécanismes d'épuisement lymphocytaires et d'apoptose.

Pour mieux comprendre le rôle des Treg dans l'atteinte du compartiment lymphocytaire T au cours de l'IS post septique, nous avons étudié le phénotype et les fonctions des lymphocytes Treg et T effecteurs *in vivo* dans notre modèle murin.

2. Résultats

a) Rôle des lymphocytes T régulateurs au cours de l'IS

Nous avons observé dès le 3^{ème} jour du sepsis l'induction d'une lymphopénie T profonde touchant les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs (CD4⁺FoxP3⁻) et non les lymphocytes Treg (CD4⁺FoxP3⁺) (**Fig.38**).

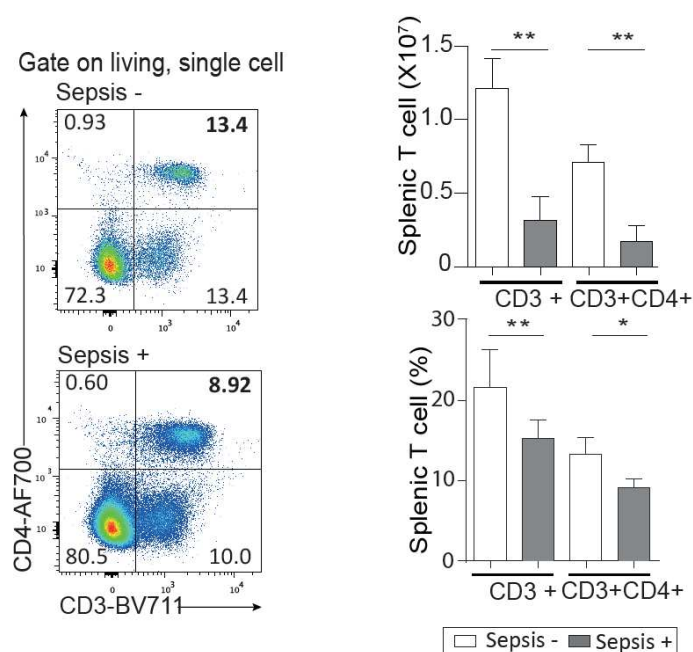


Figure 38: Lymphopénie CD4⁺ au cours de l'IS post sepsis. Analyse du taux des lymphocytes T spléniques (CD3+CD4⁺) de souris au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+) en comparaison de souris non infectées (sepsis-). Histogrammes représentatifs de la fréquence et du nombre de lymphocytes T CD3⁺ et lymphocytes T CD4⁺ dans les groupes correspondants. (n=5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes).

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, (test de Mann-whitney ou test exact de fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

Avec l'utilisation de souris **FOXP3^{GFP+}** (DEREG), nous avons observé une persistance du nombre de lymphocytes Treg spléniques au cours du sepsis associée à une lymphopénie TCD4⁺FoxP3⁻. L'IS post septique s'accompagne donc sur notre modèle de l'augmentation **du ratio Treg/Tconv (Fig.39)**.

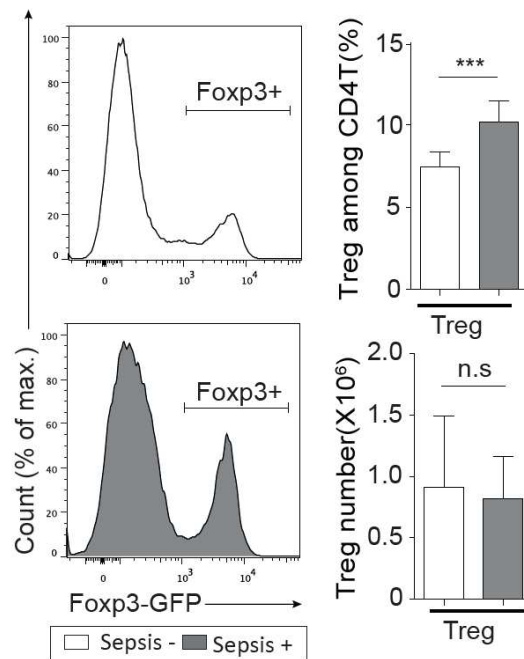


Figure 39: Persistance du nombre de Treg et augmentation ratio Treg/CD4+ au cours du sepsis. Analyse du taux des lymphocytes Treg spléniques (CD3+CD4+Foxp3+) de souris au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+) en comparaison de souris non infectées (sepsis-). Histogrammes représentatifs de la fréquence et du nombre de lymphocytes Treg CD3+CD4+Foxp3+ (n=5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (test de Mann-whitney ou test exact de fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

Cette augmentation du ratio Treg/Tconv est un argument en faveur de **l'activation des lymphocytes Treg** par un mécanisme de **résistance à l'apoptose induite par le sepsis**.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons analysé par RNA séquençage les profils d'expression transcriptomique des lymphocytes Treg spléniques au cours du sepsis en comparaison de souris non infectées. Pour cela nous avons utilisé des souris FOXP3^{GFP+} permettant d'isoler les Treg (CD4+FoxP^{GFP+}) viables au 3^{ème} jour dans les deux conditions expérimentales.

Les profils transcriptomiques des lymphocytes Treg (CD4+FoxP3^{GFP+}) au cours du sepsis en comparaison de souris non infectées sont très distincts. Parmi les 2163 gènes différentiellement exprimés ($p < 0.05$), une majorité de gènes sont sur-exprimés (1.5 fois la normale) plutôt que sous-exprimés (1.5 fois la normale), 492 versus 96 gènes (**Fig.40**).

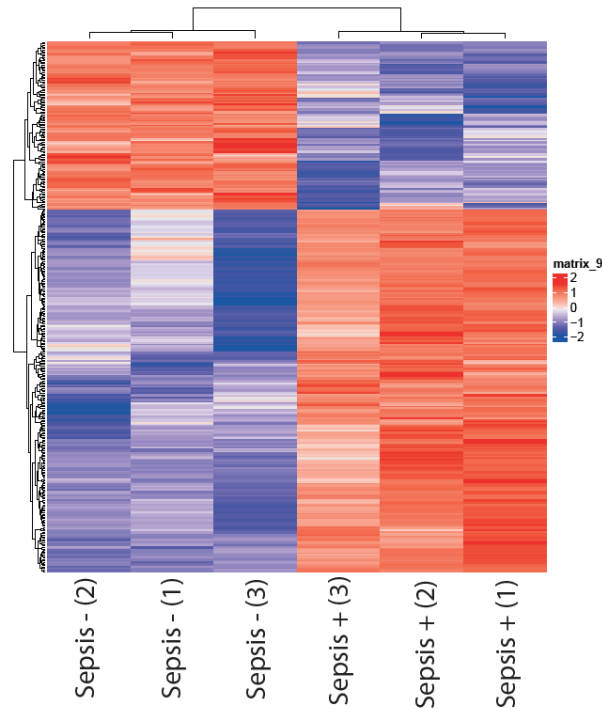


Figure 40: Analyse supervisée en cluster des gènes différentiellement exprimés ($p < 0.05$) entre les Treg de souris au 3^{ème} jour du sepsis et les souris non infectées.

Sur l'analyse en volcano plot, les gènes les plus différentiellement exprimés étaient notamment le **Gzmb**, **Ccr5**, **Saa3**, **Mki67**, **Il1r1**. Ce profil d'expression génique suggère une activation intense des lymphocytes Treg au cours du sepsis (Fig.41).

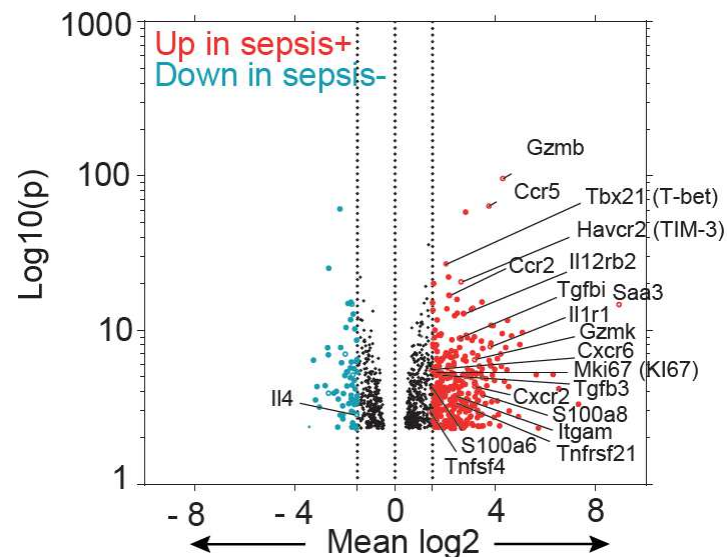


Figure 41: La signature des Treg au cours du sepsis dans notre modèle. Volcano plot exprimant les gènes différentiellement exprimés ($p < 0.05$) des Treg (CD4+Foxp3+) au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+) en comparaison des souris non infectées (sepsis-) (en rouge les gènes surexprimés à plus de 1.5 fois chez les Treg sepsis+, en bleu les gènes sous exprimés à plus de 1.5 fois). X2 test p values.

L'analyse d'ontologie génique a permis de déterminer les processus biologiques les plus significativement régulés chez les Treg au cours du sepsis (**Fig.42**).

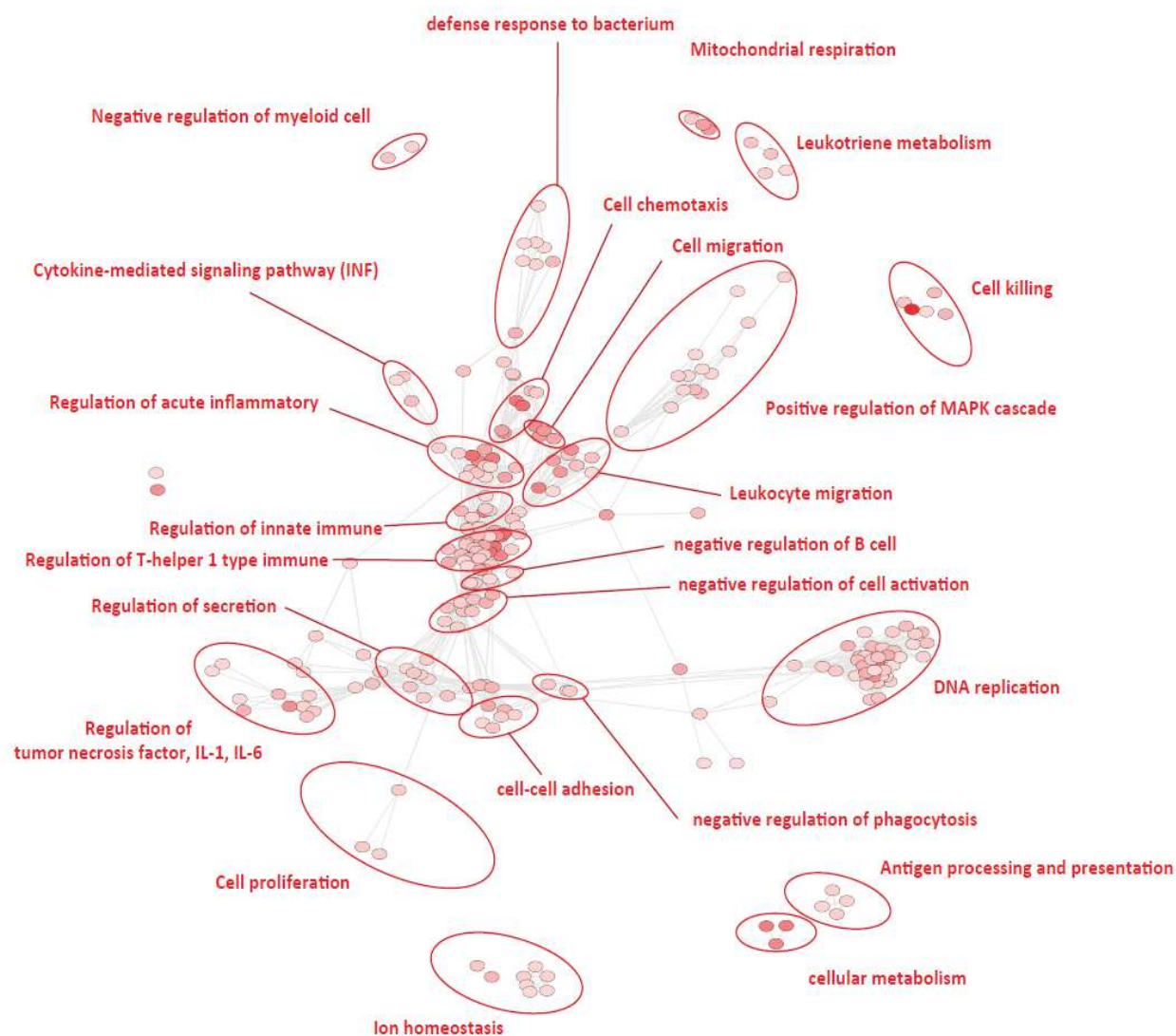


Figure 42: Les principales voies biologiques activées par le sepsis chez les Treg. Représentation du niveau d'expression par analyse ontologique de l'ensemble des gènes surexprimés (>1.5 fold change et $p < 0.05$) par les Treg au 3^{ème} jour du sepsis en comparaison de souris non infectées par analyse ontologique de processus biologique.

Les processus et voies biologiques les plus significativement activés concernent **l'activation du cycle cellulaire, l'activation cellulaire, la réplication de l'ADN, la migration cellulaire, la régulation des productions des cytokines de la TNF superfamily, la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative, la régulation des processus de mort cellulaire, l'activation de la voie NFκB (Fig.43).**

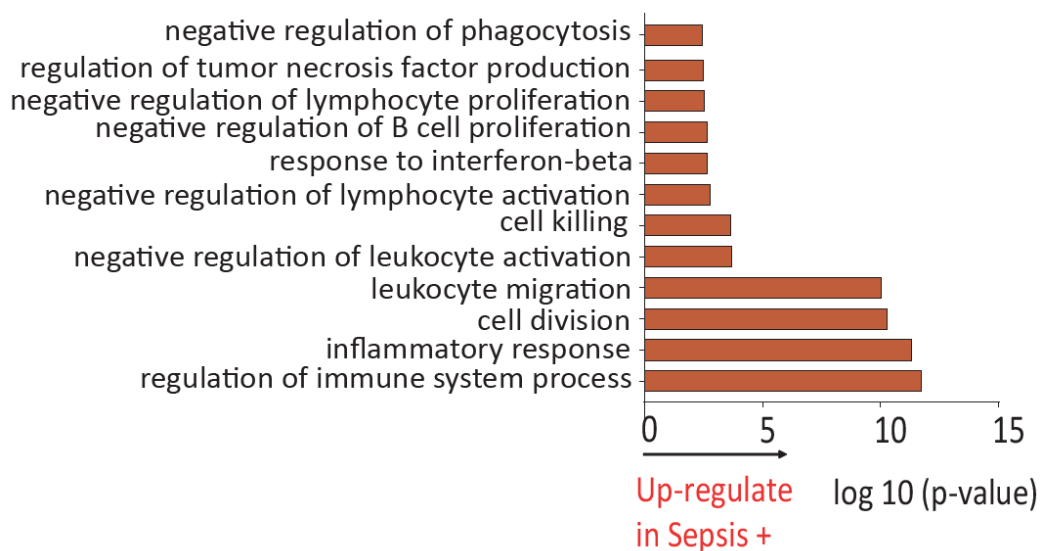


Figure 43: Les principales voies biologiques activées chez les Treg au cours de l'IS. Représentation du niveau d'expression d'un l'ensemble de gènes surexprimés par les Treg au 3^{ème} jour du sepsis en comparaison de souris non infectées par analyse ontologique de processus biologique (LOG10 (p-value)).

Nous avons comparé le profil d'expression génique des Treg au cours du sepsis avec les gènes typiques de la signature génique des eTreg (Hill et al., 2007) (**Fig.44**). Nous observons, en condition septique, une forte expression de l'ensemble des molécules régulatrices des Treg comme le **CTLA4, IL-10, Tgfb1, Ebi3(IL-35), Entpd (CD39), Tnfrsf4 (Ox40), Tnfrsf18 (GITR), Pdcd1 (PD-1), Icos, Tigit, Havcr2 (Tim-3).** Nous observons également l'expression des facteurs de transcription comme **irf4, Prdm1 (Blimp-1), Ikzf2 (Helios), Tbx21 (T-bet)** impliqués dans la différenciation des Treg en **eTreg les plus actifs.** L'ensemble de ces résultats suggèrent une forte activation des Treg par le sepsis s'accompagnant de l'expression de facteurs de régulation décrits chez les eTreg qui sont capables d'inhiber l'activation et d'induire l'apoptose des lymphocytes T effecteurs.

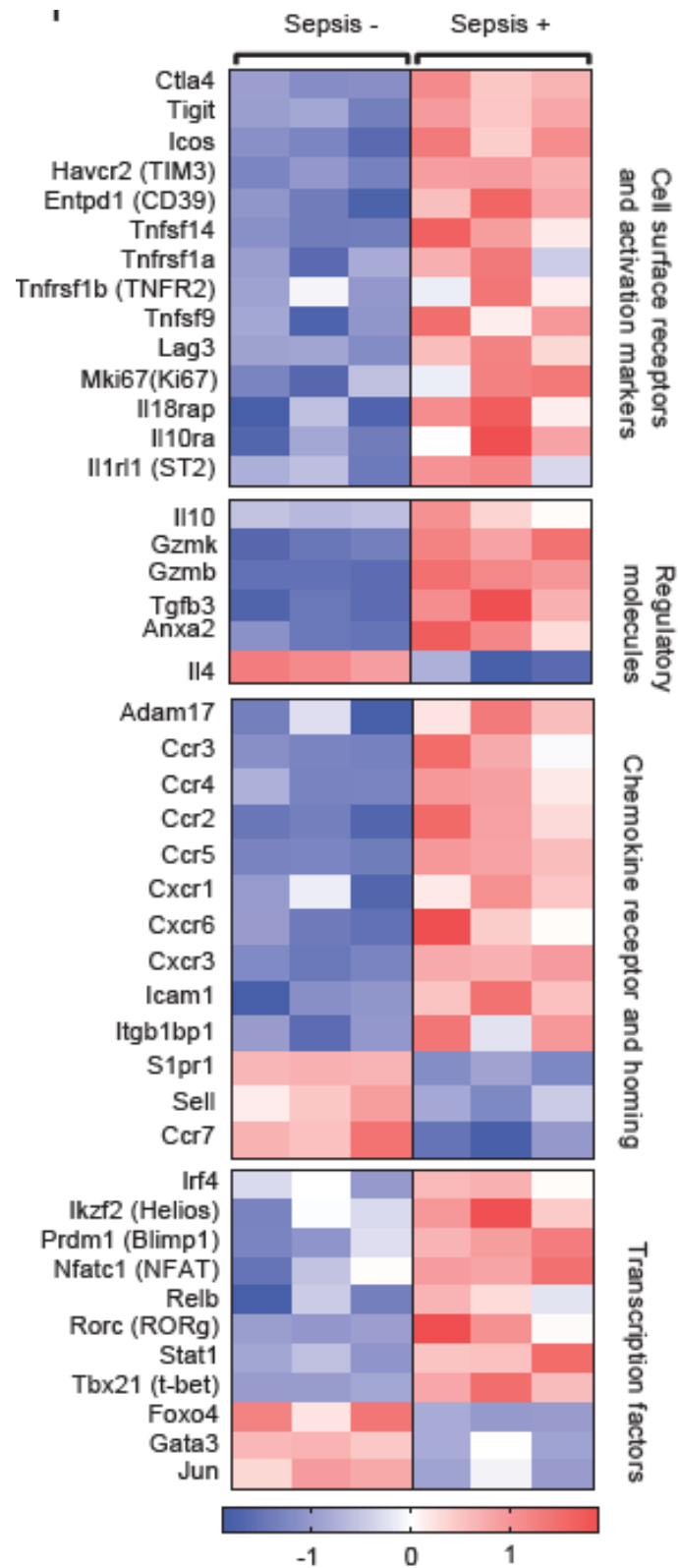


Figure 44: Phénotype de Treg effecteurs induits par le sepsis. Heat map de gènes de la signature eTreg chez les Treg au 3^{ème} jour du sepsis en comparaison des souris non infectées.

Parmi les familles de gènes surexprimés au cours du sepsis, l'analyse complémentaire par enrichissement, suggèrent l'activation préférentiel des voies **TNF α /NF κ B** et **IL-2/STAT5** (Liberzon et al., 2015). L'activation et la stabilité des fonctions effectrices des Treg sont sous la dépendance de la voie IL2/STAT5 (Chinen et al., 2016) (Mahmud et al., 2013) (**Fig.45**). Nous retrouvons également de manière associé à l'activation de la voie **IL2/stat5**, une activation de la voie des **mTOR**, qui ont également été décrits comme associés à l'activation et au maintien des fonctions inhibitrices des Treg suite à la costimulation de leur TCR et de l'IL2 (Zeng et al., 2013)(Vaeth et al., 2019) (Fan and Turka, 2018).

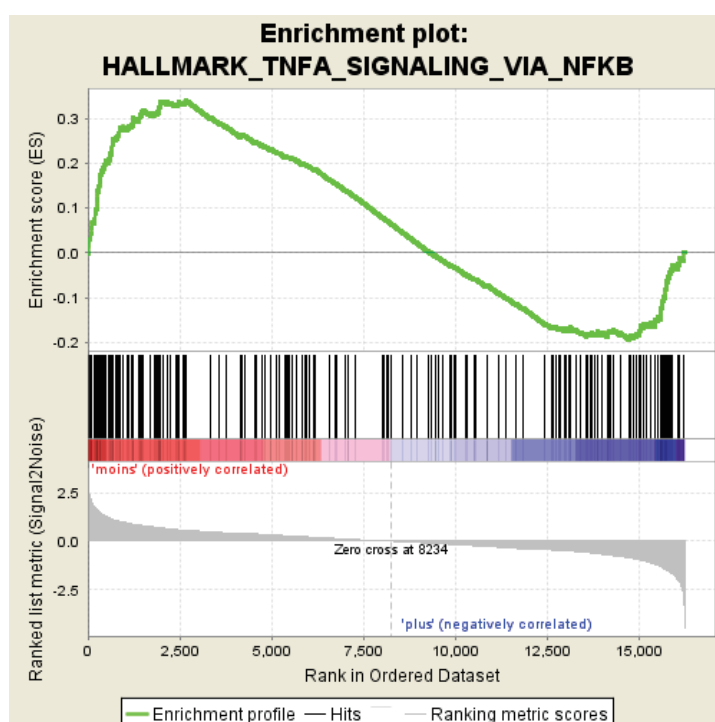


Table: GSEA Results Summary

Dataset	test_gsea S versus T 2_collapsed_to_symbols.pheno.cls#moins_versus_plus
Phenotype	pheno.cls#moins_versus_plus
Upregulated in class	moins
GeneSet	HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB
Enrichment Score (ES)	0.33993956
Normalized Enrichment Score (NES)	1.659844
Nominal p-value	0.0
FDR q-value	0.0
FWER p-Value	0.0

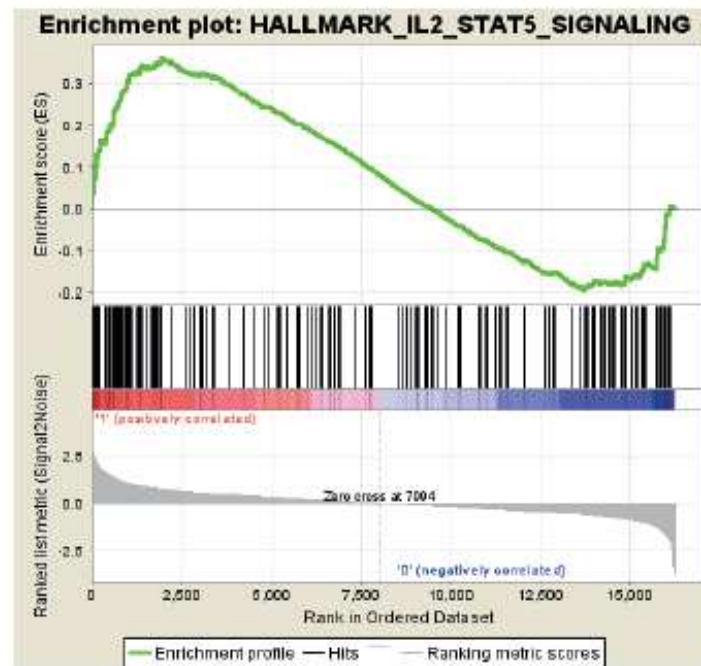


Table: GSEA Results Summary

Dataset	test_gsea S versus T_collapsed_to_symbols.pheno.cls #plus_versus_moins.pheno.cls #plus_versus_moins_repos
Phenotype	pheno.cls#plus_versus_moins_repos
Upregulated in class	1
GeneSet	HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING
Enrichment Score (ES)	0.36382025
Normalized Enrichment Score (NES)	1.6469512
Nominal p-value	0.0
FDR q-value	0.0
FWER p-Value	0.0

Figure 45: Analyse de l'ensemble des gènes différentiellement exprimés des Treg au cours du sepsis par enrichissement (GSEA broad) mettant en évidence l'implication des voies TNF/NFκB et IL2/stat5.

Parmi les gènes différentiellement exprimés nous observons une forte expression de l'ensemble des gènes de la « superfamille du récepteur du TNF » : TNFR2 (Tnfsrf1b), OX-40 (Tnfsrf4), CD27 (Tnfsrf7), CD30 (Tnfsrf8), 4-1BB (TNFRsf9), HVEM (Tnfsrf14), GITR (Tnfsrf Tnfsrf18), ainsi que l'activation de gène la voie de NFκB(Fig.44) suggérant le rôle activateur du TNF sur les Treg en condition de sepsis.

Nous avons analysé par cytométrie en flux les variations phénotypiques des lymphocytes Treg (CD4+Foxp3^{GFP+}) spléniques au 3^{ème} jour en comparaison de souris non infectées. Nous avons observé, une diminution de l'expression du CD62L associée à l'augmentation d'expression du CD25 (Levine et al., 2014) (Kitagawa and Sakaguchi, 2017), du CTLA-4 et d'IL-10 (Fig.46).

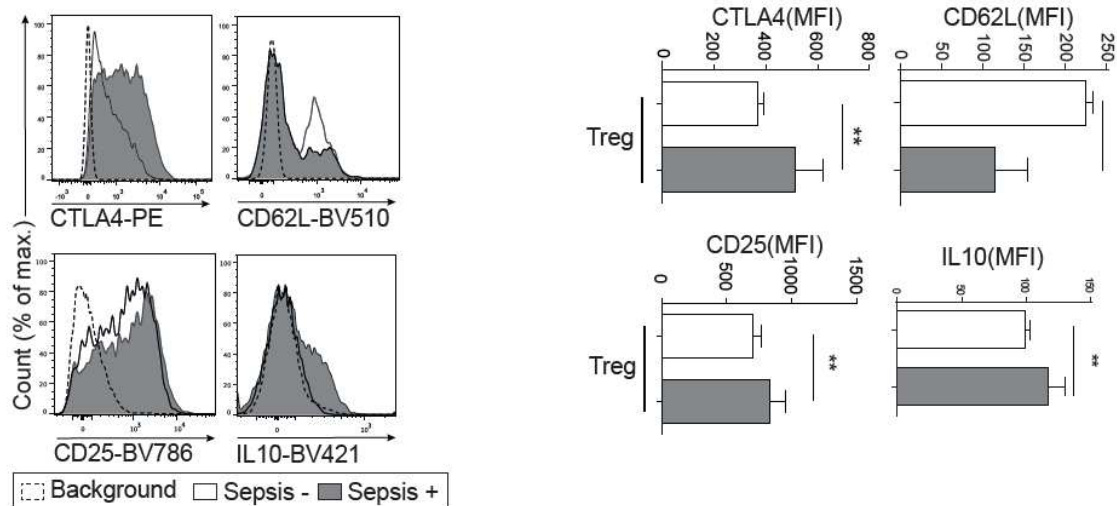


Figure 46: L'activation des lymphocytes Treg au cours du sepsis est marquée par une expression de CTLA4, CD25 et IL10 et une diminution d'expression de CD62L. Expression du CTLA4, d'IL-10 intracellulaire, du CD62L et du CD25 membranaire des lymphocytes Treg spléniques (CD3+CD4+Foxp3+) de souris au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+) en comparaison de souris non infectées (sepsis-). Histogrammes représentatifs de la moyenne de fluorescence des mêmes marqueurs. (n=5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de Mann-whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Pour évaluer le rôle fonctionnel des Treg au cours de l'IS post septique, nous avons utilisé des souris génétiquement modifiées (DEREG), chez lesquelles il est possible d'induire une délétion conditionnelle profonde de plus de 90% de la population des Treg (CD4+FoxP3^{GFP+}) par l'injection de toxine diphtérique (DT). Nous avons observé que cette déplétion restait efficace chez les souris non infectées comme en condition de sepsis (**fig.47**).

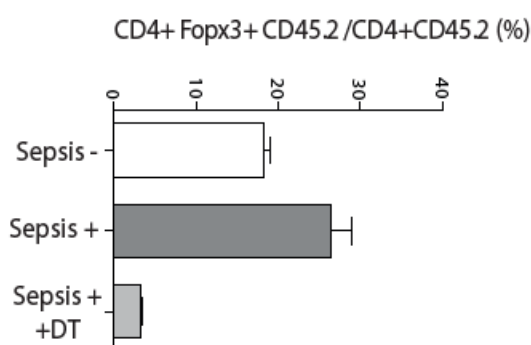


Figure 47: Contrôle de la déplétion efficace en Treg par la DT en condition de sepsis. Pourcentage des Treg CD4+FoxP3+ parmi les lymphocytes CD4 dans des souris non infectées (sepsis-), des souris au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+), ou après injection de DT (toutes les 12h pendant 24h puis toutes les 24h) le premier jour du sepsis (sepsis+DT) chez des souris DEREG. (n=5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test exact de fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

Nous avons observé que la déplétion précoce en Treg au cours du sepsis permet de restaurer la prolifération des lymphocytes OTII et s'accompagne d'une restauration partielle de la lymphopénie induite par le sepsis dans la souris receveuse (**Fig.48**).

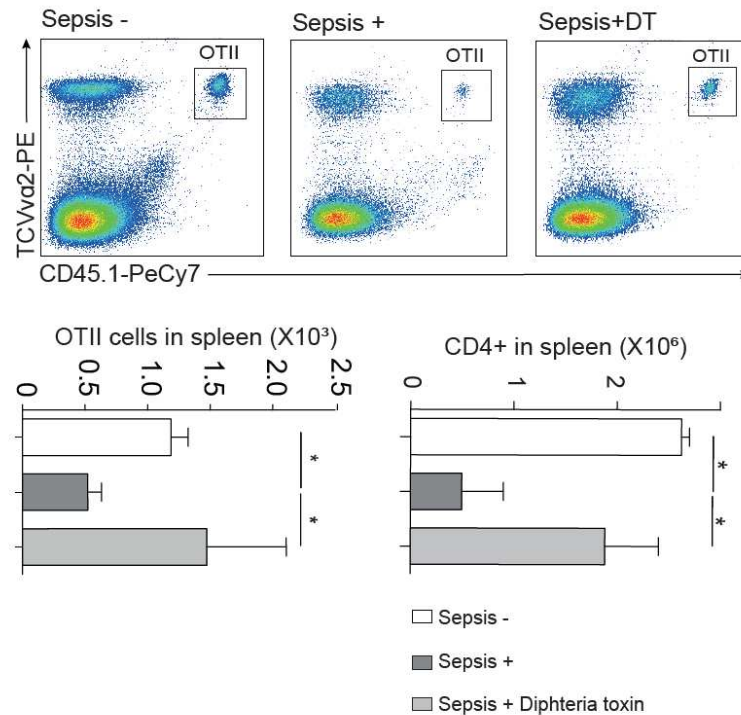


Figure 48: La restauration des capacités fonctionnelles lymphocytaires T secondaire à la déplétion des Treg au cours de l'IS. Analyse des splénocytes au 5^{ème} jour du transfert adoptif de cellules CD4+CD45.1 OTII injectées avec une suspension d'Ovalbumine en intra-veineux à des souris CD45.2 au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+) ou non infectées (sepsis-), en comparaison au 3^{ème} jour du sepsis avec déplétion des Treg par injection de DT (sepsis+DT). Histogramme (panel du bas) représentant le nombre de splénocytes CD4+CD45.1 TCRva+ (à gauche) et de CD4+CD45.2 (à droite) dans les groupes correspondants. (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de Mann-whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

La déplétion en lymphocyte Treg à la phase précoce du sepsis s'accompagnait d'une correction de la lymphopénie et de modifications phénotypiques des lymphocytes T CD4+FoxP3- caractérisées par une augmentation d'expression du **CD25** et **d'une perte d'expression du CD62L**. La déplétion à la phase précoce du sepsis des Treg s'accompagne donc **d'une augmentation des marqueurs d'activation des lymphocytes TCD4+FoxP3-** (Fig.49).

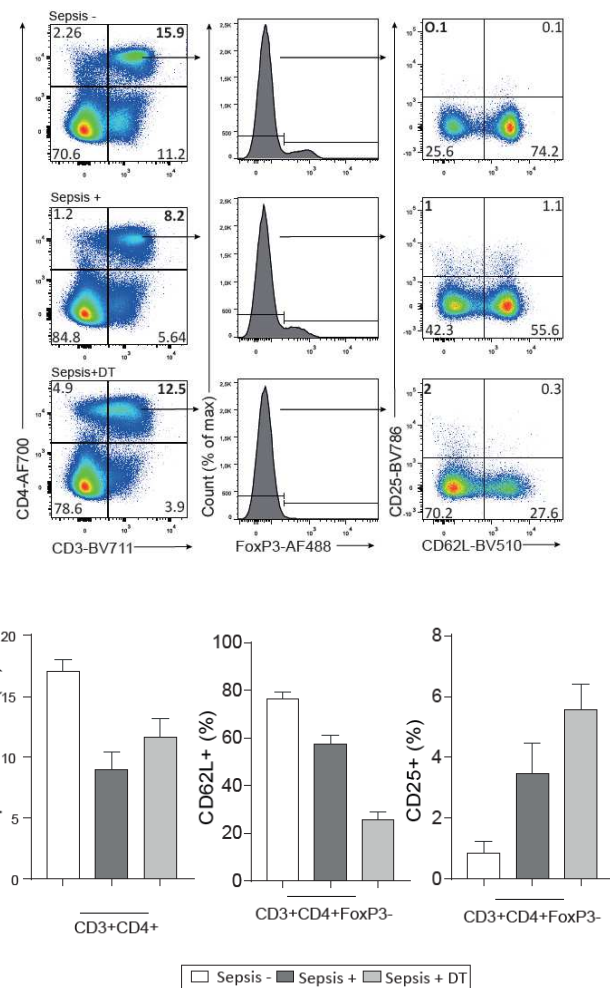


Figure 49: La déplétion à la phase précoce du sepsis des Treg s'accompagne d'une augmentation des marqueurs d'activation des lymphocytes T effecteurs (TCD4+FoxP3-). Analyse des lymphocytes T CD3+CD4+ de souris non infectées (sepsis-), de souris au 3ième jour du sepsis (sepsis+) et de souris au 3ième jour du sepsis avec délétion des Treg par injection de DT (sepsis+DT). Analyse des groupes correspondant avec ratio de l'expression de FoxP3 parmi les lymphocytes T CD3+CD4+ (au centre) et l'expression de CD62L, CD25 de la population TCD3+CD4+FoxP3-. Histogramme (panel de bas) représentant le nombre de splénocytes CD3+CD4+ (à gauche) et le ratio CD62L (au centre) et CD25+ (à droite) parmi les TCD3+CD4+FoxP3-. (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

*p < 0.05, **p < 0.01, *p < 0.01, (test de Mann-whitney et test exact de fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

Enfin, nous avons observé que la déplétion des Treg à la phase précoce du sepsis s'accompagnait d'une diminution d'expression de PD1 sur les lymphocytes T CD4+Foxp3- dans le groupe sepsis + pneumopathie et d'une restauration de l'afflux en polynucléaire à la suite de la pneumopathie (Fig.50).

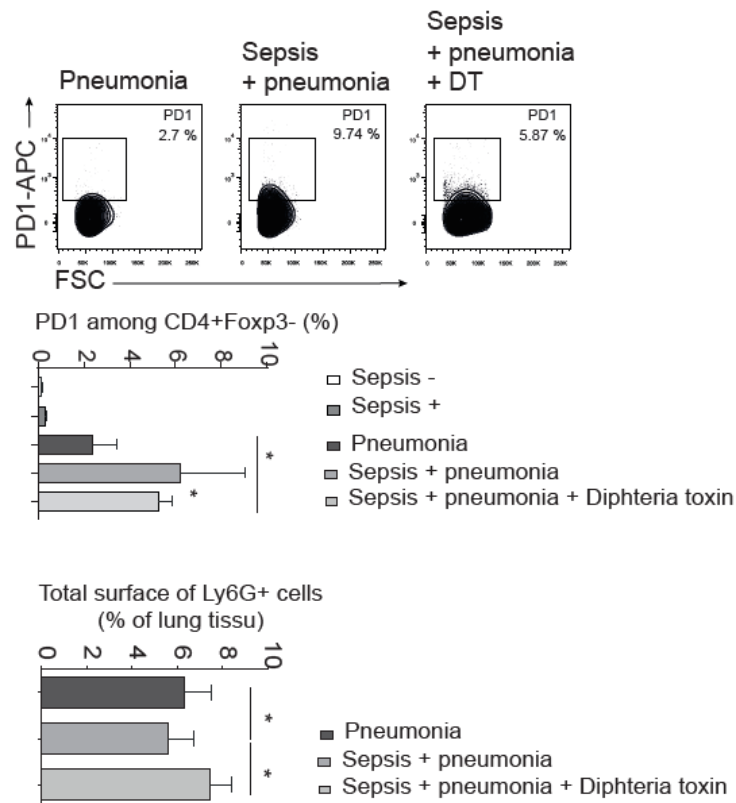


Figure 50: la déplétion des Treg à la phase précoce de l'IS s'accompagne d'une diminution d'expression de PD1 sur les lymphocytes T CD4+Foxp3 et d'une restauration de l'afflux en polynucléaire à la suite de la pneumopathie. Niveau d'expression membranaire de la program-death 1 protein sur les lymphocytes (CD3+CD4+FoxP3GFP-) spléniques, 24 h après la pneumopathie seule à *P. aeruginosa* (pneumonia), ou au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+pneumonia) et au 3^{ème} jour du sepsis avec déplétion des Treg par injection de DT (sepsis+pneumonia+DT)). Histogramme (panel de gauche) représentant le pourcentage de splénocytes CD3+CD4+FoxP3-PD1+ parmi les CD3+CD4+Foxp3- et la quantification par analyse SIOX de l'infiltrat en polynucléaires neutrophiles à 24h de la pneumopathie dans les groupes correspondants (panel de droite). (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de exact fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

Conclusion de la partie 2 :

L'ensemble de ces expériences suggère que le sepsis s'accompagne d'une lymphopénie profonde et d'une activation des Treg impliquée dans l'IS post septique. La déplétion précoce des Treg au cours du sepsis permet de restaurer les stigmates d'épuisement lymphocytaire, les marqueurs fonctionnels de l'IS in vivo.

L'IS précoce induite par le sepsis à staphylocoque aureus implique les lymphocytes Treg qui semblent participer aux altérations profondes des capacités de réponses de l'immunité innée et adaptative favorisant les infections secondaires.

3. Rôle du récepteur au TNF de type 2 (TNFR2) exprimé par les lymphocytes T régulateurs au cours de l'IS post septique

1. Introduction

Les Treg TNFR2 ont une forte capacité de prolifération en condition inflammatoire (He et al., 2016). En absence de TNFR2 les Treg ne sont plus capables de contrôler la réponse inflammatoire (van Mierlo et al., 2008). Le marquage TNFR2 permet d'identifier une population puissamment immunosuppressive parmi les Treg Foxp3+CD25-, ce qui explique que le tri des Treg CD4+TNFR2+ permet d'isoler une population quatre fois plus suppressive que le tri CD4+CD25+ (Chen et al., 2008) .

Notre analyse du profil transcriptomique des Treg au cours du sepsis nous ayant indiqué une forte activation de la voie du TNF α , nous avons étudié le rôle des Treg TNFR2 sur notre modèle au cours de l'IS post septique.

2. Résultats

Le TNFR2 est majoritairement exprimé par les lymphocytes Treg (CD4+FoxP3+) en condition physiologique et de sepsis en comparaison des lymphocytes T effecteurs (CD4+FoxP3-) et CD4- (**fig.51**).

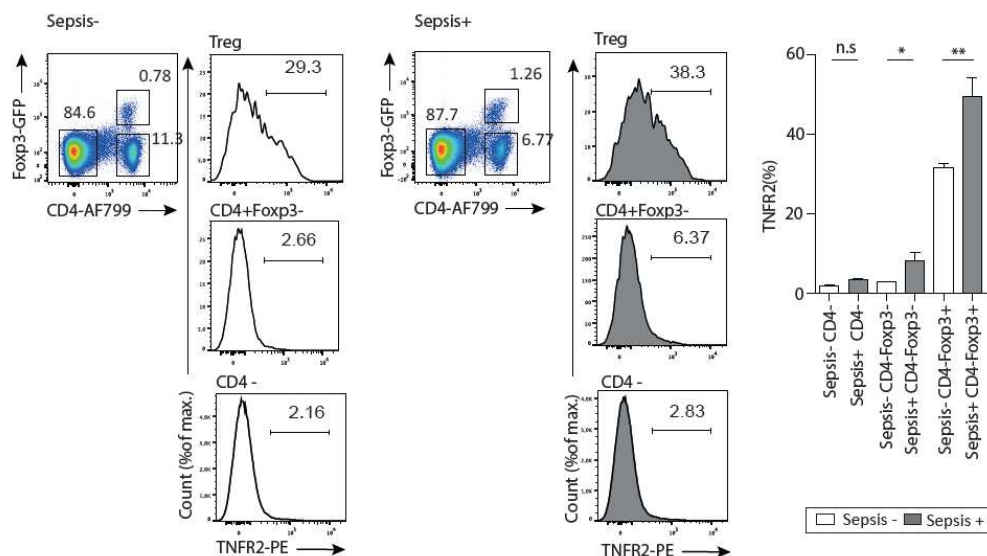


Figure 51 : Le TNFR2 est majoritairement exprimé par les Treg. Expression du TNFR2 membranaire sur les lymphocytes Treg (CD4+Foxp3GFP+), les Tconv (CD4+FoxP3GFP-) et les splénocytes CD4-, chez des souris en sepsis (sepsis+) ou non (sepsis-). Histogramme correspondant. (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

*p < 0.05, **p < 0.01, *p < 0.01, (test de Mann-whitney et test exact de fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

Nous avons retrouvé au cours du sepsis une augmentation du pourcentage et du nombre absolu de Treg TNFR2 (**Fig.52**).

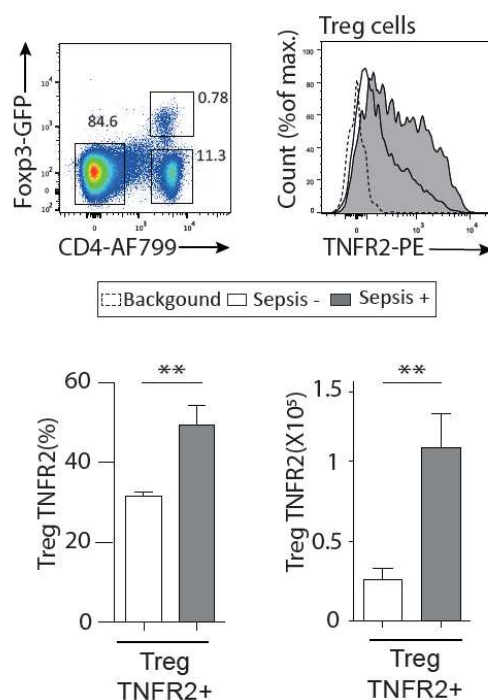


Figure 52: Le sepsis s'accompagne d'une augmentation du pourcentage et du nombre de lymphocytes Treg TNFR2. Expression du TNFR2 membranaire sur les lymphocytes Treg (CD4+Fop3GFP+) chez des souris en sepsis (sepsis+) ou non (sepsis-). Histogramme représentant le pourcentage et le nombre de Treg TNFR2 correspondant. (n=5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de Mann-whitney et test exact de fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

Nous avons comparé les profils d'expression transcriptomique au cours du sepsis des lymphocytes Treg TNFR2 (CD4+Fop3+TNFR2+) et lymphocytes Treg TNFR2-. Parmi les 2937 gènes significativement exprimés ($p < 0.05$), 194 étaient d'avantage exprimés et 415 moins exprimés à plus de 1.5 fois (**Fig.53**).

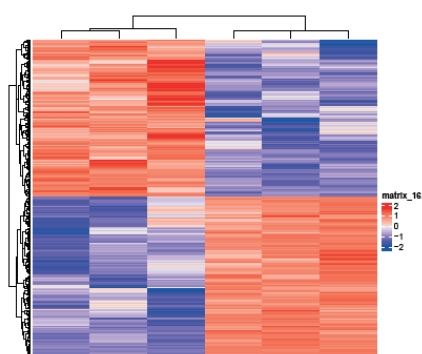


Figure 53: Analyse supervisée en cluster des gènes différemment exprimés ($p < 0.05$) entre les TregTNFR2+ et Treg TNFR2- au cours du sepsis.

L'analyse comparative des profils d'expression génique suggère que les principales modifications phénotypiques retrouvées chez les Treg en condition de sepsis sont associés à l'expression de TNFR2. En effet l'analyse de variance des PCA (Principal Component Analysis) est en faveur d'une plus forte homologie entre les profils de Treg en condition de sepsis et les Treg TNFR2+ au cours du sepsis (Fig.54).

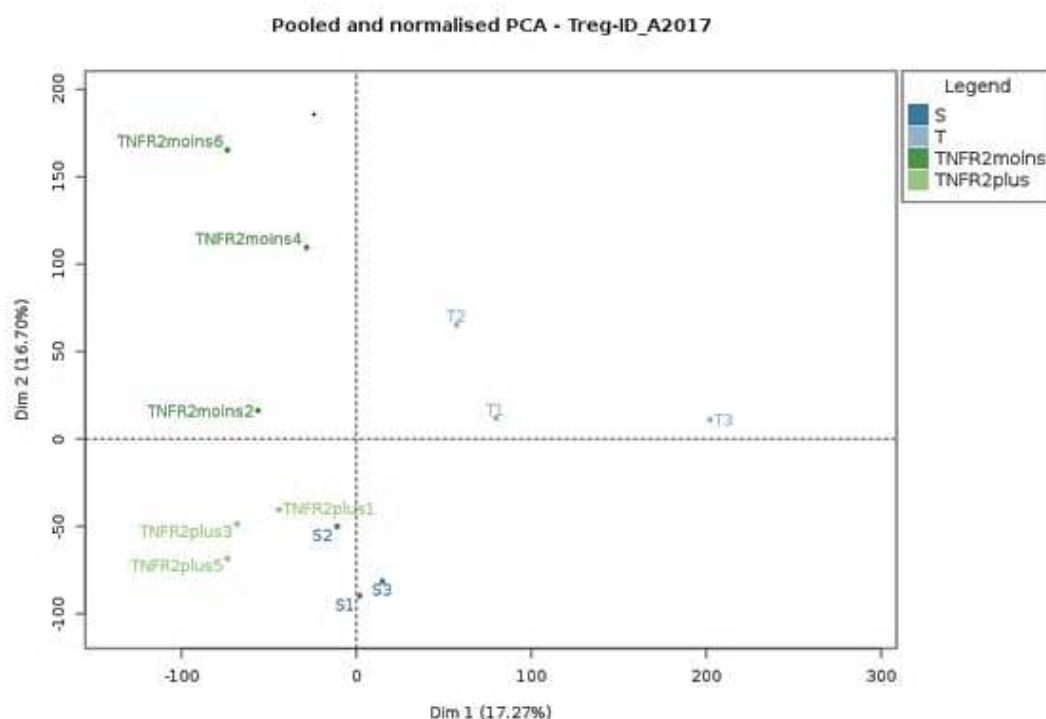


Figure 54: Analyse des variances d'expression génique chez les TregTNFR2+ et Treg TNFR2- au cours du sepsis.

L'analyse des gènes différentiellement exprimés dans l'ensemble des conditions (sepsis+/-, TNFR2+/-) permet d'identifier 3 clusters géniques spécifiques de nos populations de Treg (**fig.55**).

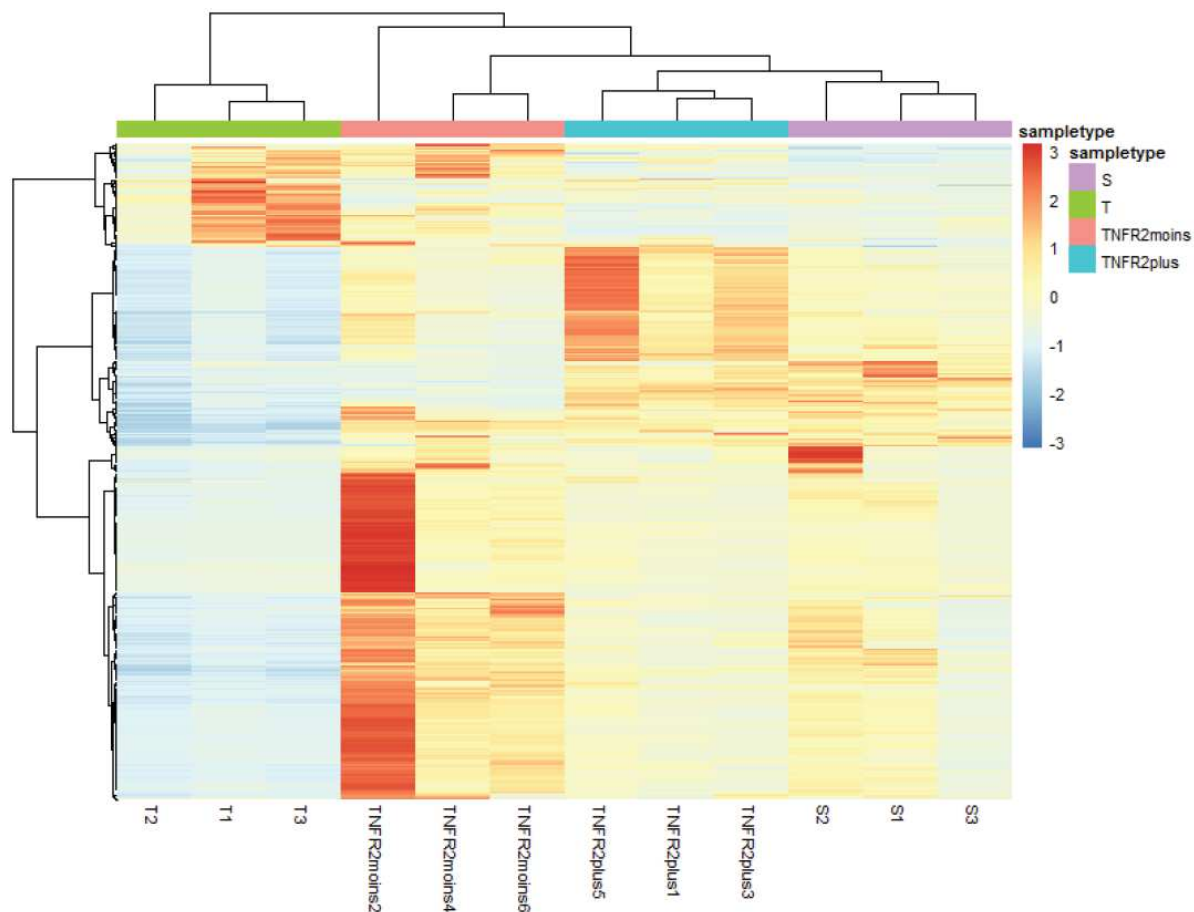


Figure 55 : Clusters géniques permettant de différencier nos populations de Treg. Heatmap représentant l'analyse supervisée en cluster des gènes différentiellement exprimés des Treg ($CD4+Foxp3^{GFP+}$) dans des souris septiques (S), des souris non septique (T) et des Treg TNFR2+ (TNFR2plus) et TNFR2- (TNFR2moins) au cours du sepsis.

Les Treg TNFR2+ au cours du sepsis expriment la majorité des gènes marqueurs des Treg effecteurs (fig.56).

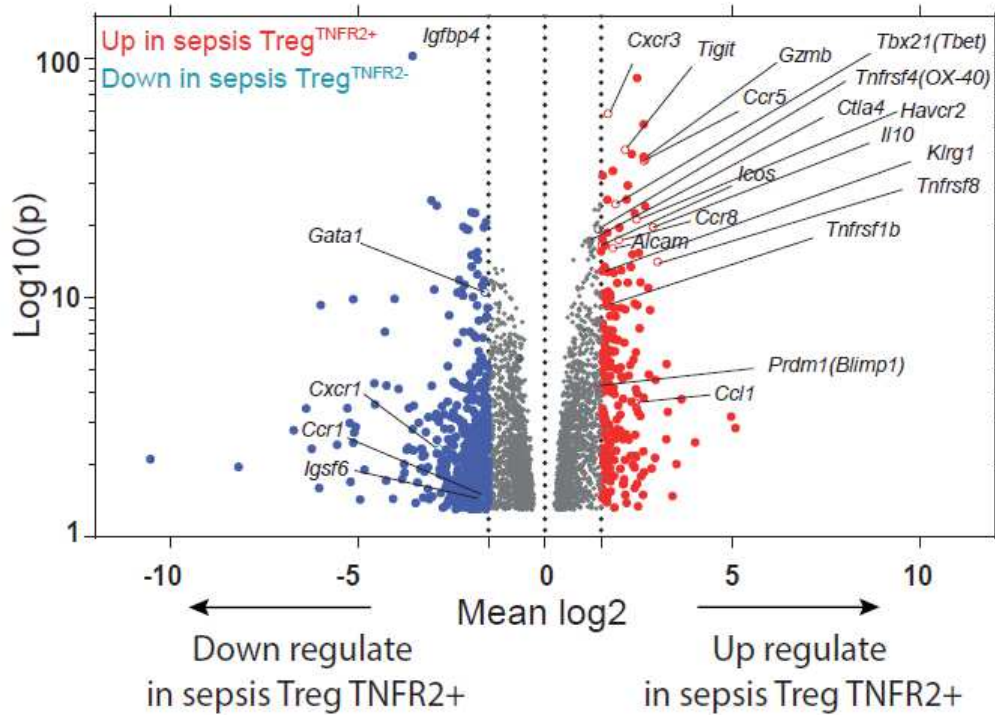


Figure 56: Volcano plot (panel du haut) exprimant les gènes différentiellement exprimés ($p < 0.05$) chez les Treg^{TNFR2+} et Treg^{TNFR2-} au cours du sepsis (en rouge les gènes surexprimés à plus de 1.5 fois chez les Treg^{TNFR2+}, en bleu les gènes sous exprimés à plus de 1.5 fois). X2 test p values.

Parmi les gènes les plus différentiellement exprimés entre les Treg TNFR2+ et TNFR2- au cours du sepsis, nous retrouvons un profil d'expression génique compatible avec celui des lymphocytes Treg effecteurs les plus immunosuppresseurs (Fig.67).

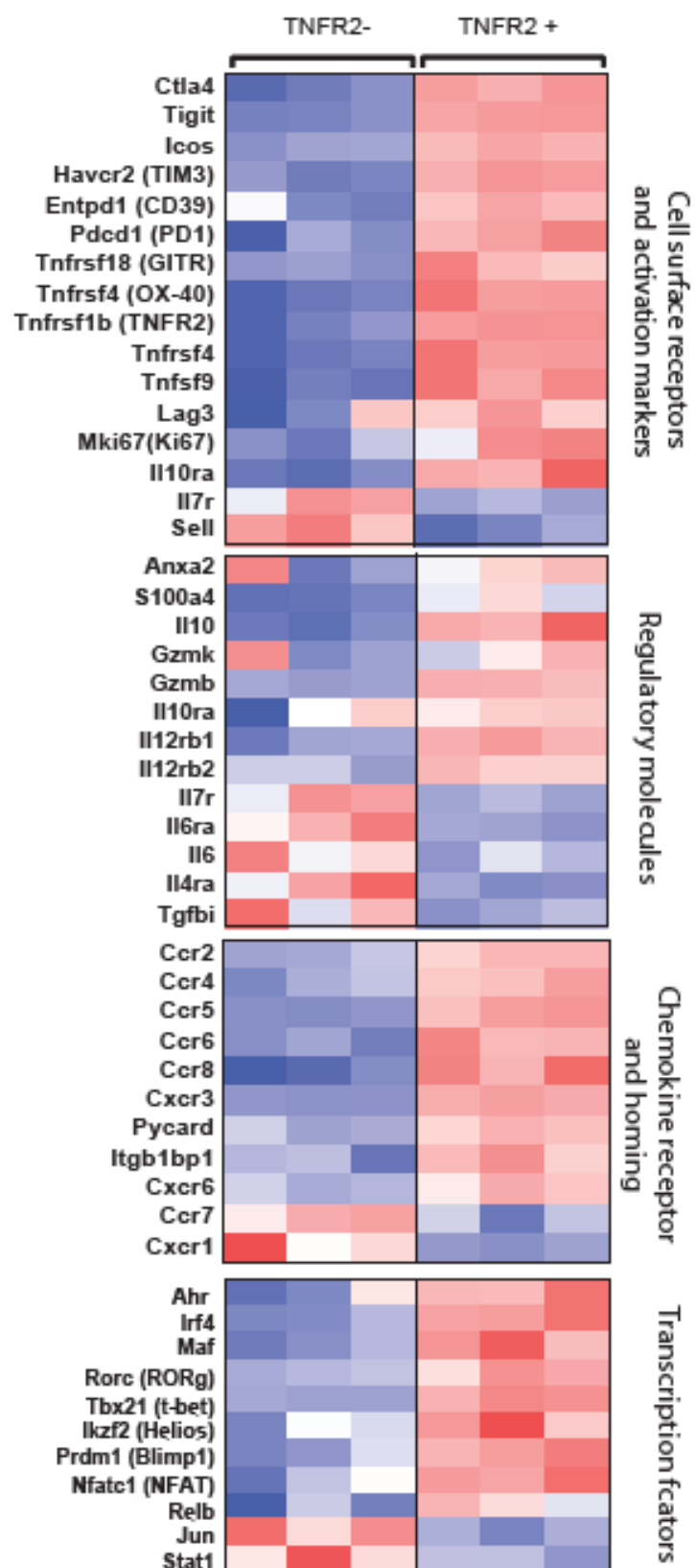


Figure 57: Heat map de gènes de la signature eTreg chez les TregTNFR2+ et Treg TNFR2- au cours du sepsis.

L'analyse du profil transcriptomique des gènes par ontologie des grandes fonctions biologiques nous suggère une forte prolifération et une plus forte activité immunosuppressive des Treg TNFR2+ en comparaison des Treg TNFR2- au cours du sepsis (**Fig.58**).

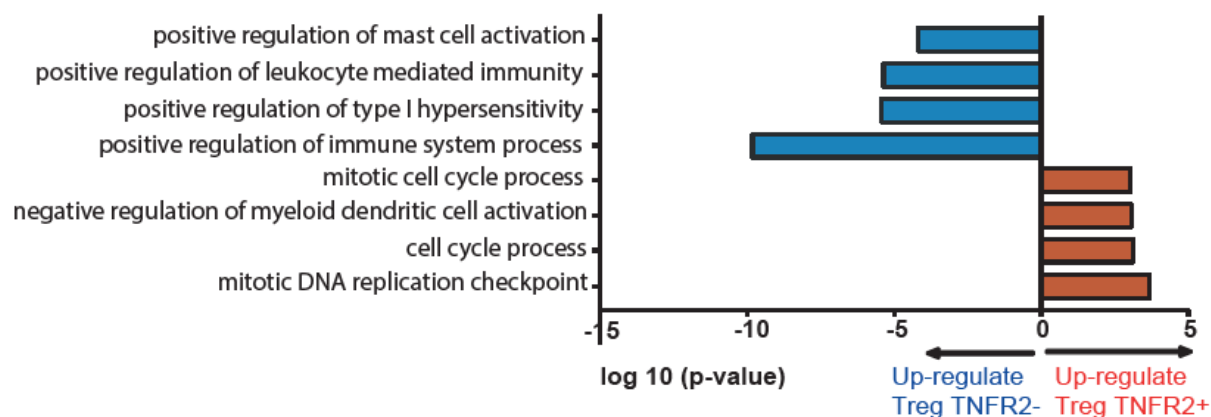


Figure 58 : Représentation par analyse ontologique de processus biologique du niveau d'expression d'ensemble de gènes surexprimés par les Treg TNFR2+ en comparaison des Treg TNFR2- au 3^{ème} jour du sepsis.

La surexpression des gènes inhibiteurs d'apoptose chez les Treg TNFR2+ au cours du sepsis suggère de manière associée à leur prolifération un maintien de cette population au cours du sepsis (**Fig.59**).

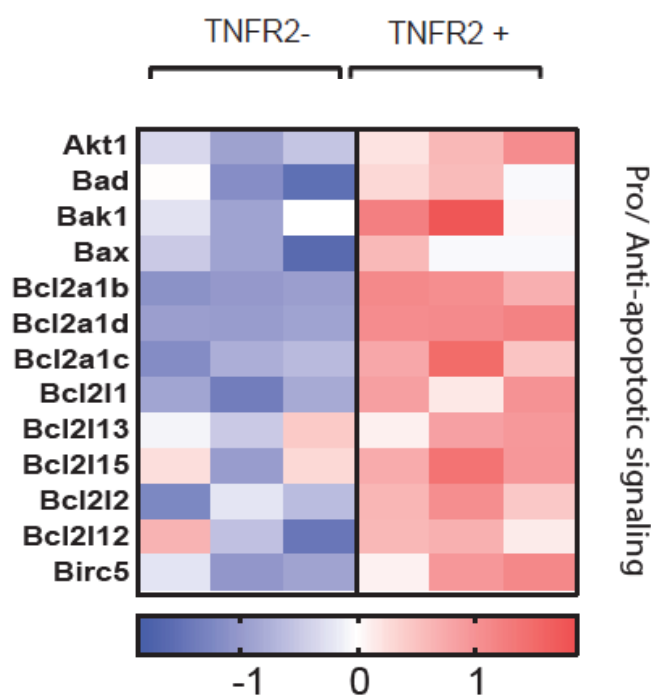


Figure 59: Heat map de gènes inhibiteurs d'apoptose chez les TregTNFR2+ et Treg TNFR2- au cours du sepsis.

Nous observons un enrichissement significatif des voies de signalisation IL2/STAT5 en faveur des TNFR2+ (**Fig.60**).

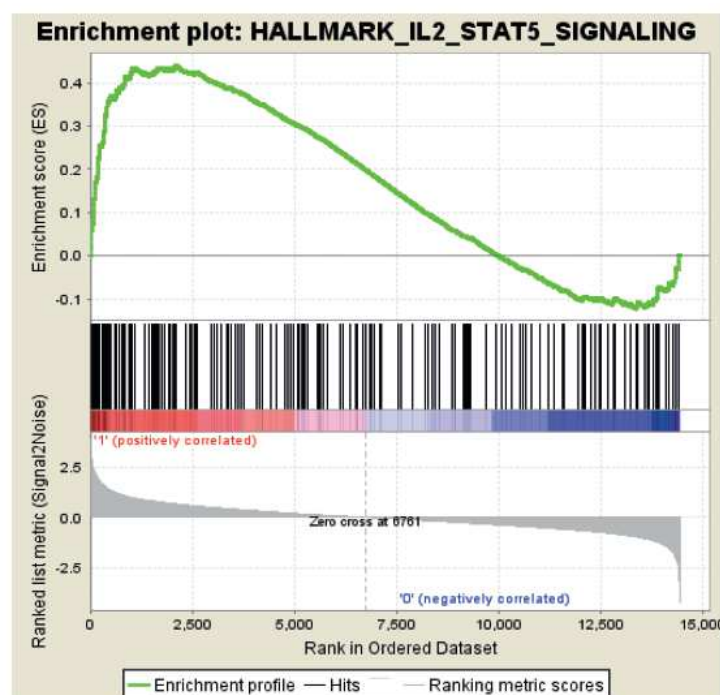


Table: GSEA Results Summary

Dataset	fichier_gsea TNFR2+_collapsed_to_symbols.pheno.cls #plus_versus_moins.pheno.cls #plus_versus_moins_repos
Phenotype	pheno.cls#plus_versus_moins_repos
Upregulated in class	1
GeneSet	HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING
Enrichment Score (ES)	0.44076133
Normalized Enrichment Score (NES)	2.0460773
Nominal p-value	0.0
FDR q-value	0.0
FWER p-Value	0.0

Figure 60: analyse de l'enrichissement de la voie IL-2/STAT5, réalisé avec l'ensemble de gènes différentiellement exprimés chez les TregTNFR2+ et Treg TNFR2- au cours du sepsis (data set : M5947, GSEA).

Nous avons confirmé en cytométrie en flux l'augmentation d'expression significative de CTLA4 intracellulaire parmi les Treg TNFR2+ (**Fig.61**).

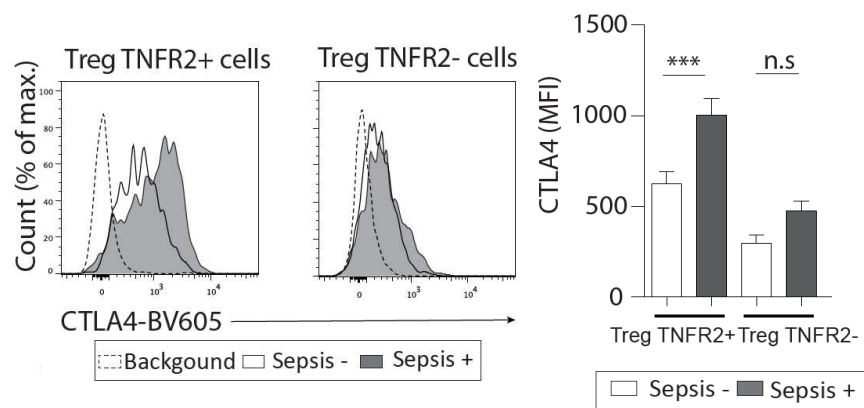


Figure 61: Expression du CTLA4 intracellulaire exprimé chez les TregTNFR2+ et Treg TNFR2- au cours du sepsis. Histogramme représentatif de la moyenne de fluorescence de CTLA4 dans les lymphocytes Treg TNFR2+ et TNFR2-. (n=5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de Mann-whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Pour valider le rôle spécifique du TNFR2 au cours de l'activation des Treg, nous avons ensuite utilisé des **souris TNFR2 KO**.

L'induction du sepsis chez les souris TNFR2KO ne s'accompagnait pas d'une lymphopénie ni d'une augmentation du ratio Treg/Tconv au 3^{ème} jour du sepsis (fig.62).

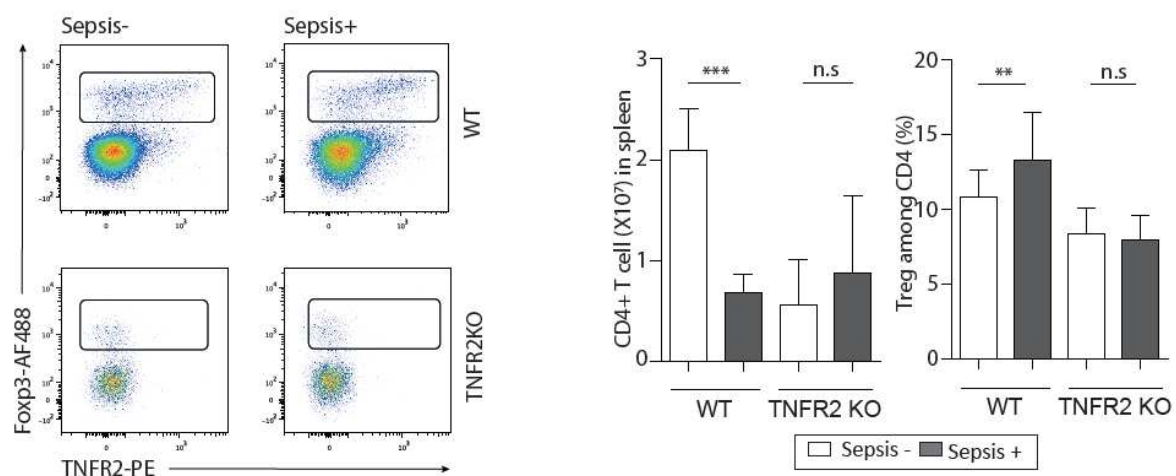


Figure 62: Perte de l'augmentation du ratio Treg/T CD4+ lié à l'IS post septique chez les souris TNFR2KO au cours du sepsis. Analyse des lymphocytes T spléniques (CD3+CD4+) et Treg (CD3+CD4+FoxP3+) de souris au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+) en comparaison de souris non infectées (sepsis-) et de souris TNFR2KO dans les mêmes conditions expérimentales. Histogrammes représentatifs de la fréquence et du nombre de lymphocytes T CD3+CD4+ et lymphocytes Treg CD3+CD4+FoxP3+ dans les groupes correspondants. (n=5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de Mann-whitney ou test exact de fisher). Représentation des médianes et interquartiles.

Ce résultat suggère une **absence d'activation des lymphocytes Treg chez des souris TNFR2KO avec le sepsis**. Renforçant cette hypothèse, nous **n'avons pas observé d'induction d'expression intracellulaire de CTLA4 chez les Treg en condition de sepsis des souris TNFR2KO (Fig.63)**.

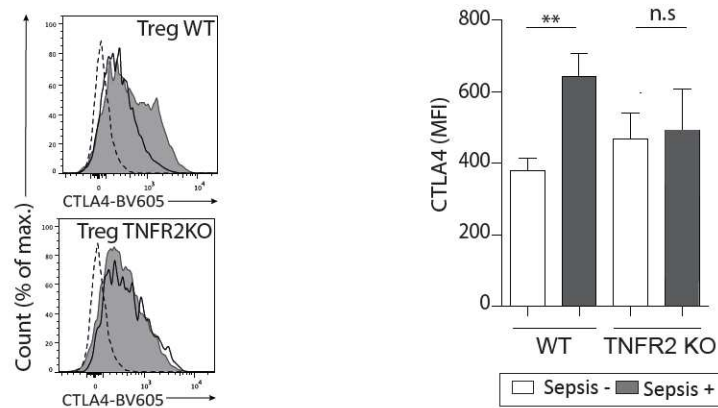


Figure 63: Expression du CTLA4 intracellulaire exprimé chez les Treg au cours du sepsis en comparaison de souris non infectées, chez des souris WT (Wild type) et des souris TNFR2KO. Histogrammes représentatifs de la moyenne de fluorescence de CTLA4. (n=5 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de Mann-whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Cette absence d'expression de marqueur phénotypique d'activation chez les Treg KO était associée à la persistance de la prolifération des lymphocytes OTII transférés au 3^{ème} jour du sepsis chez des souris TNFR2KO (Fig.64).

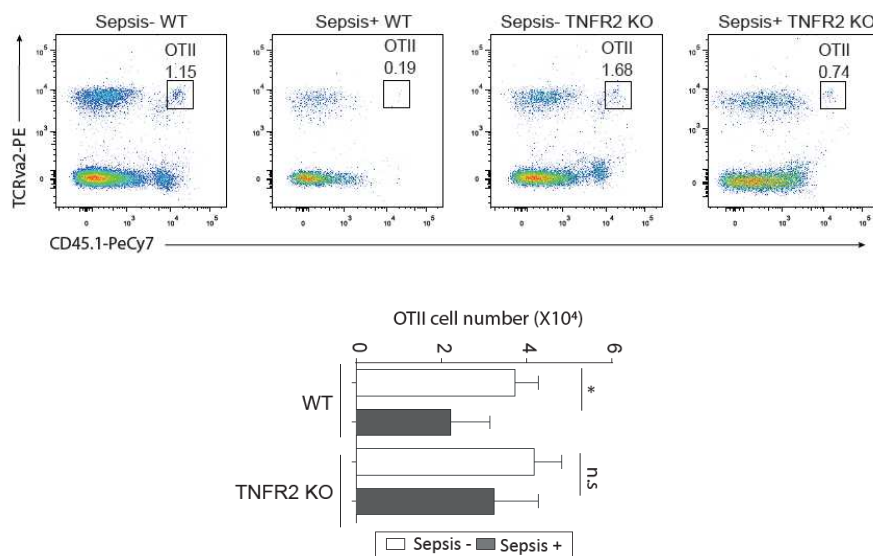


Figure 64: Persistance de la prolifération lymphocytaire T in vivo chez les souris TNFR2KO au cours du sepsis. Analyse de splénocytes au 5^{ème} jour après le transfert adoptif de cellules CD4+CD45.1 OTII injectées avec une suspension d'Ovalbumine en intra-veineux à des souris CD45.2 au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+) ou non infectées (sepsis-), en comparaison des mêmes temps expérimentaux chez des souris TNFR2KO. Histogramme (panel de bas) représentant le nombre de splénocytes CD4+CD45.1 TCRva+ dans les groupes correspondants. (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de Mann-whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

L'ensemble de ces résultats suggèrent le rôle activateur du TNFR2 pour les Treg au cours du sepsis. Le blocage du TNFR2 pourrait donc permettre de limiter l'activation des Treg et donc limiter la susceptibilité aux infections secondaires. Nous avons donc utilisé un anticorps monoclonal bloquant spécifiquement l'activation du TNFR2 (anti-TNFR2) afin d'évaluer son efficacité pour le traitement de l'IS post septique.

Le traitement par anticorps anti-TNFR2 (Ab) des souris septiques est associé à une diminution du marquage TNFR2 sur les Treg et d'une correction significative de la lymphopénie induite par le sepsis (fig.65).

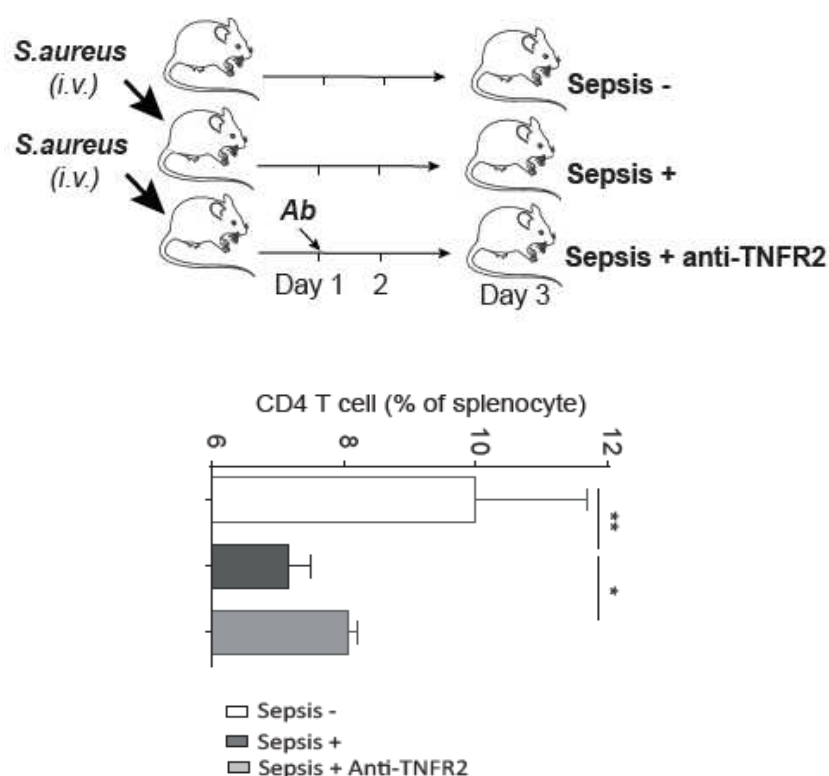


Figure 65: Correction de la lymphopénie induite par le sepsis par le traitement anti-TNFR2 au cours du sepsis. Schéma expérimental du traitement anti-TNFR2 au cours du sepsis (panel du haut). Pourcentage de CD4+ parmi les splénocytes dans les différents groupes chez les souris au 3^{ème} du sepsis, traité par anti-TNFR2 et chez les souris non infectées (panel en bas à droite).

Nous avons également observé une restauration partielle de la prolifération des lymphocytes OTII transférées au 3^{ème} jour du sepsis avec le traitement par anticorps anti-TNFR2. Ce dernier s'accompagnait également d'une correction de la lymphopénie post septique chez les souris receveuses au cours de la même expérience (Fig.76).

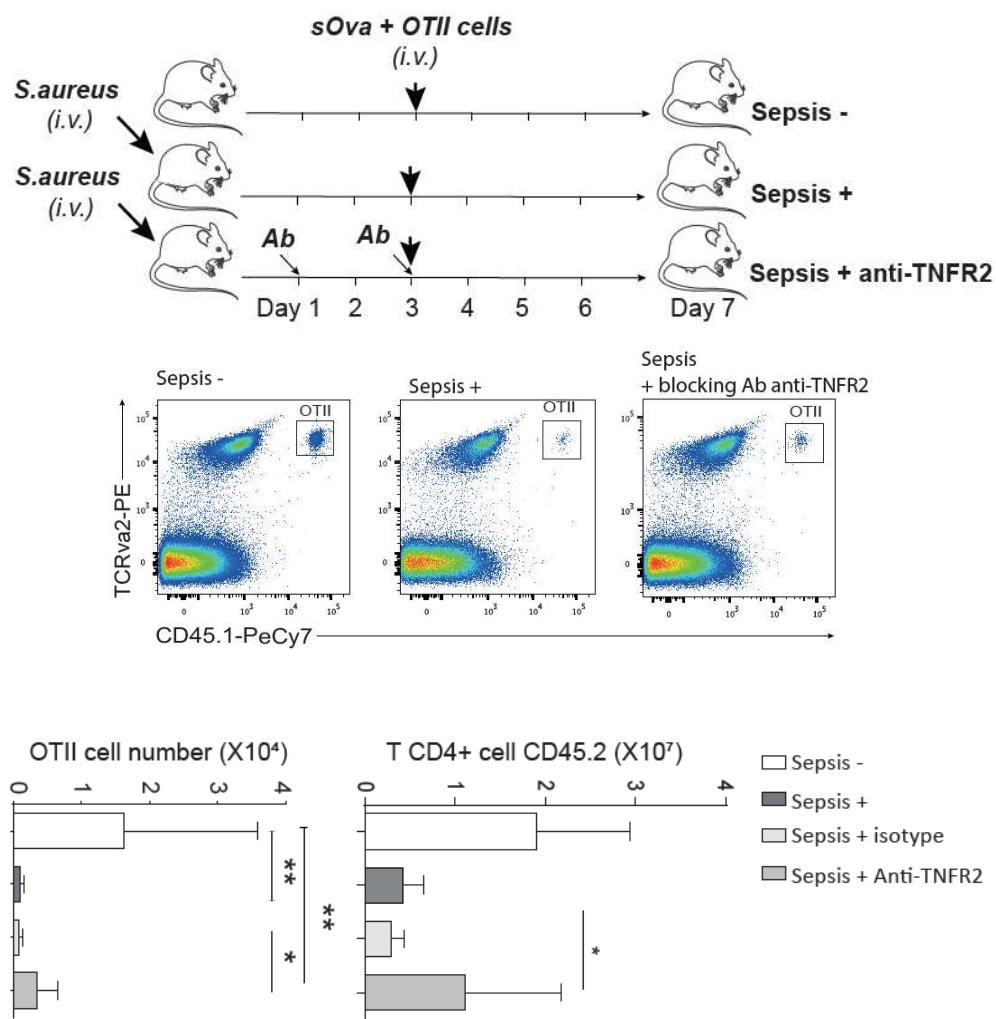


Figure 66: Restauration partielle de la prolifération lymphocytaire T in vivo chez les souris au cours du sepsis traité par anti-TNFR2. Analyse de la prolifération splénique des cellules CD4+CD45.1 OTII injectées avec une suspension d'Ovalbumine en intra-veineux à des souris CD45.2 au 3^{ème} jour du sepsis (sepsis+), non infectées (sepsis-), ou en comparaison de souris septiques traitées par anti-TNFR2 (Sepsis+ blocking Ab anti-TNFR2). Histogramme (panel de bas) représentant le nombre de splénocytes CD4+CD45.1 TCR α + (à gauche) et de CD4+CD45.2 (à droite) dans les groupes correspondants. (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (test de Mann-whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Nous avons observé que l'IS post septique était associée une augmentation de la susceptibilité à une pneumopathie secondaire à *p. aeruginosa*. Nous avons donc traité les animaux par anticorps anti-TNFR2 à la phase précoce du sepsis afin d'évaluer leur susceptibilité à une infection secondaire pulmonaire (Fig.67).

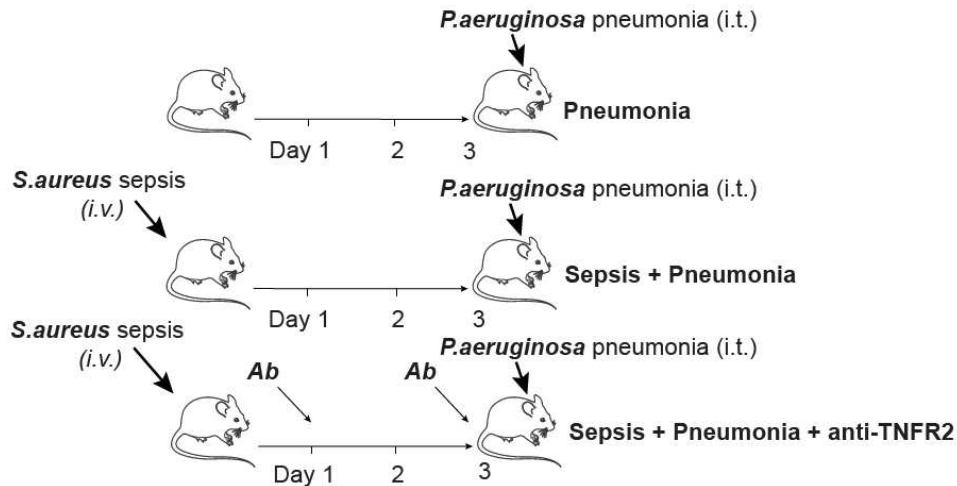


Figure 67: schéma expérimental du traitement par anti-TNFR2 au cours du modèle double hit.

Nous avons ainsi observé une **restauration partielle de l'afflux des polynucléaires** à 24h de la pneumopathie chez les souris traitées par anti-TNFR2 au cours du sepsis en comparaison des souris septiques non traitées (Fig.73).

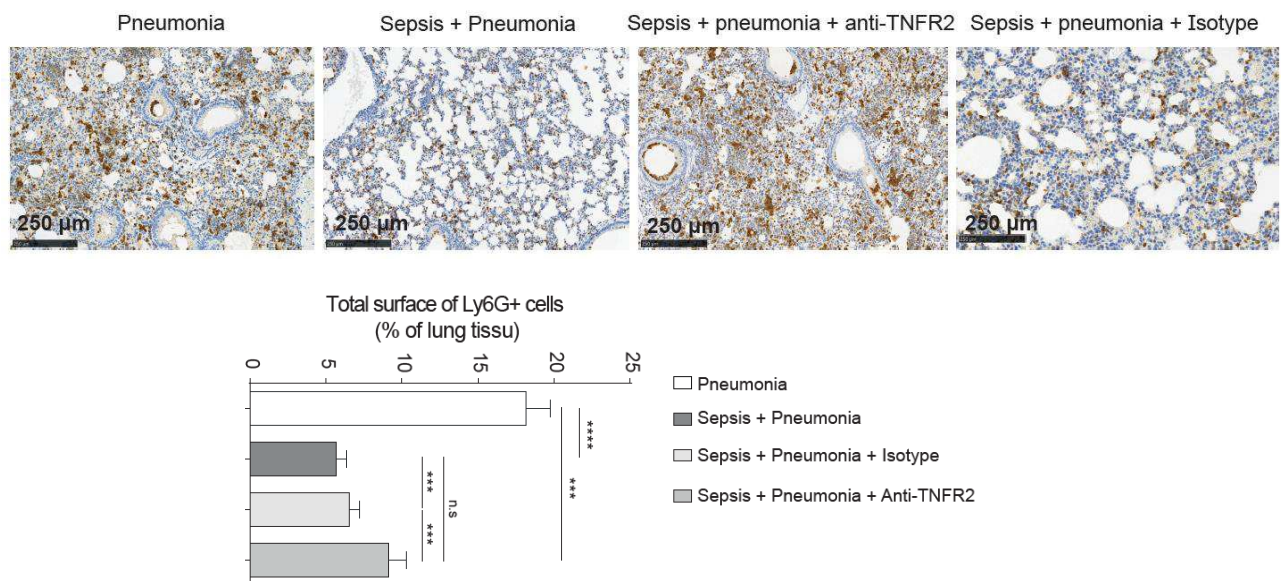


Figure 68: Restauration de l'afflux en polynucléaires neutrophile par le traitement par anti-TNFR2 au cours de l'IS post septique. Coupes histologiques pulmonaires avec marquage immunohistochimique par anticorps anti-Ly6-G à 24h d'une pneumopathie à *P. aeruginosa* seule (pneumonia), en comparaison de souris à 24h de la pneumopathie au 3ième jours du sepsis par *S. aureus* (sepsis+pneumonia) et traitées par un anticorps anti-TNFR2 (sepsis+pneumonia+anti-TNFR2) ou par un isotype (sepsis+pneumonia+Isotype) (grossissement X20, échelle = 100 μ m). Histogramme représentant la quantification par analyse SIOX de l'infiltrat en polynucléaires neutrophiles dans les groupes correspondants. (n=4 souris par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, (Mann-Whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Conclusion de la partie 3 :

L'ensemble de ces expériences suggère que l'activation des Treg observée au cours du sepsis dans ce modèle est principalement associée à l'expression membranaire du TNFR2. Les Treg TNFR2+ présentent un profil de Treg effecteurs au cours du sepsis. La déplétion et le blocage du récepteur TNFR2 au cours du sepsis permettent de diminuer l'épuisement lymphocytaire et de restaurer certaines fonctions immunitaires (prolifération OTII et afflux de polynucléaires neutrophiles) in vivo. Globalement, ces résultats suggèrent que le blocage du TNFR2 au cours de l'IS post septique pourrait permettre de restaurer les capacités de défenses de l'hôte en inhibant l'activation des Treg.

4. Etude des lymphocytes T régulateurs TNFR2 chez l'homme

1. Introduction

Nous avons pour la dernière partie de ce travail, étudié les populations de lymphocytes T de patients pris en charge pour choc septique dans un service réanimation.

2. Résultats

Nous avons mis en contact *ex vivo* les PBMC de donneurs sains avec la souche de *S.aureus* utilisée dans le modèle murin. Pour cela les PBMC sont mis en culture avec un inoculum de *S.aureus* (m.o.i : 1 pour 1) pendant 2 heures, puis de la GENTAMICINE à dose bactéricide est ajoutée au milieu pendant 20 min avant lavage. Les cellules sont ensuite analysées après 48h de culture en présence d'IL-2 en cytométrie de flux. Nous avons observé que cette stimulation des PBMC s'accompagnait d'une lymphopénie CD4+ profonde associée à la persistance du nombre de Treg (CD4+ FoxP3+ comme les CD4+CD25+CD127-FoxP3+). Comme dans notre modèle murin, le ratio Treg/Tconv est significativement augmenté au cours du sepsis. Les lymphocytes Treg définis par le co-marquage CD4+CD25+CD127-FoxP3+, présentent en condition de sepsis, une augmentation d'expression membranaire de TNFR2 (**Fig.69**).

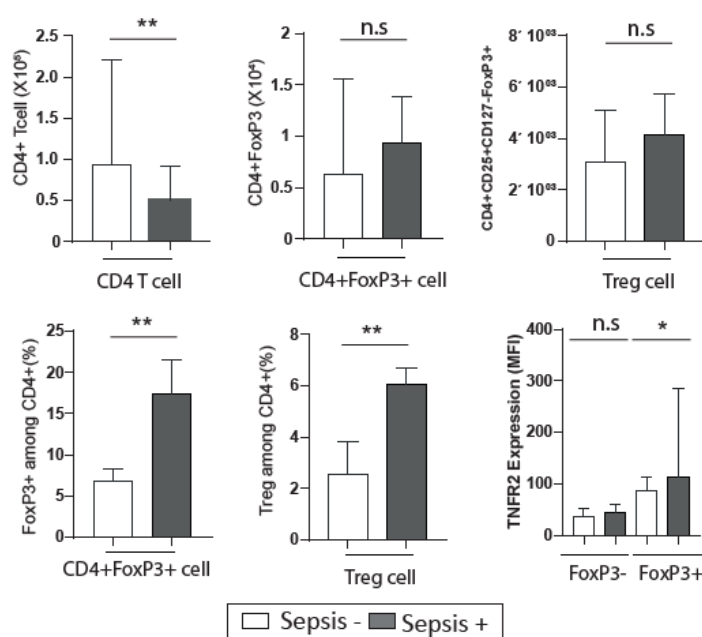


Figure 69: Lymphopénie CD4+ et augmentation du ratio Treg/TCD4+ induites par la stimulation directe de PBMC par *S. aureus*. Analyse en cytométrie en flux des PBMC humain de donneurs sains après 48h d'une stimulation par co-culture avec *S.aureus*. Histogramme représentant le nombre de lymphocytes CD4+, CD4+FoxP3+, Treg (CD4+CD25+CD127-FoxP3+) et le pourcentage de CD4+FoxP3+, Treg (CD4+CD25+CD127-FoxP3+) parmi les lymphocytes T CD4+, ainsi que le niveau d'expression de TNFR2 en MFI en fonction du niveau d'expression de Foxp3 parmi les lymphocytes T CD4+. (n=5 échantillons par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes). *p < 0.05, **p < 0.01, *p < 0.01, (Mann-Whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Parmi ces Treg, les **Treg TNFR2+** expriment significativement plus **CTLA4** et **CD25** en condition **d'infection** en comparaison des Treg TNFR2- (fig.70).

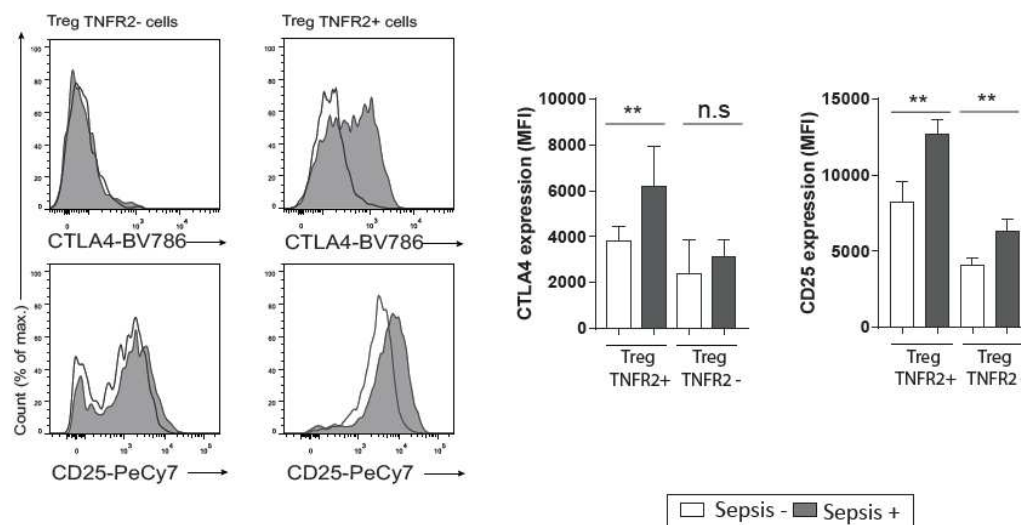


Figure 70: Activation des TregTNFR2+ induites par la stimulation directe de PBMC par *S. aureus*. Analyse en cytométrie en flux de PBMC humain de donneurs sains après 48h d'une stimulation par co-culture avec *S. aureus*. Histogramme représentant le niveau d'expression en moyenne de fluorescence (MFI) intracellulaire en CTLA-4 et membranaire du CD25 chez les lymphocytes Treg (CD4+CD25+CD127-FoxP3+) en fonction de leur expression du TNFR2. (n=5 échantillons par groupe, ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.01$, (Mann-Whitney). Représentation des médianes et interquartiles.

Les lymphocytes Treg TNFR2 sont décrits chez l'homme comme étant la population de Treg la plus puissamment immunosuppressive dans des pathologies inflammatoires chroniques comme au cours des cancers (Salomon et al., 2018) (Chen et al., 2008). Les résultats obtenus dans des modèle murins suggèrent que les Treg TNFR2+ pourraient participer à l'initiation précoce de l'IS au cours du sepsis et du choc septique. Peu de données sont disponibles chez l'homme concernant les Treg TNFR2 et le choc septique.

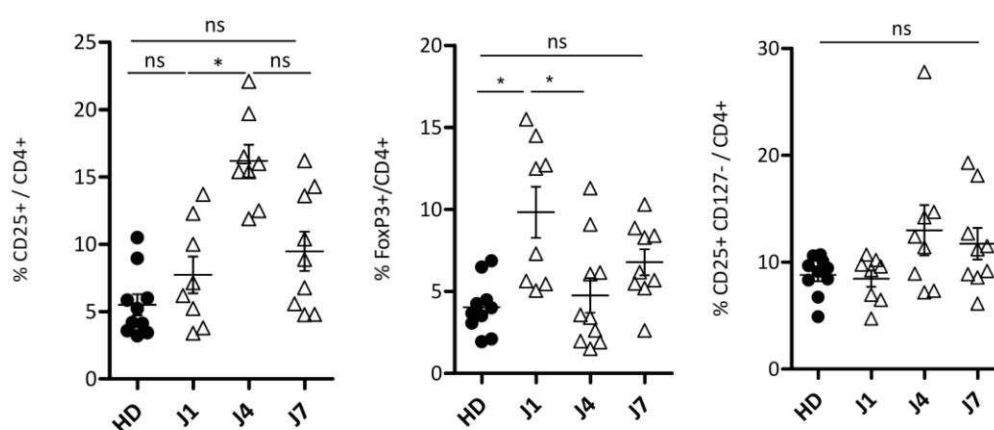
Nous avons analysé le phénotype des lymphocytes T dont les lymphocytes Treg sur une biocollection de patients pris en charge pour choc septique au CHU de Nantes (Biocollection IBIS sepsis). Au total, entre mars 2016 et septembre 2017, 29 patients ont été inclus dans cette cohorte. Nous avons sélectionné 10 patients pour lesquels l'ensemble des échantillons de PBMC étaient disponibles à chacun des temps suivants J1, J4 et J7 après l'admission en réanimation.

Les caractéristiques de ces 10 patients sont présentées dans le **tableau 4**. Les patients étaient âgés de 46 à 80 ans ; 8 (80%) d'entre eux étaient des hommes.

Patients	Sexe	Age (ans)	Contexte carcinologique	Comorbidité cardiaque	Comorbidité pulmonaire	Diabète	Foyer infectieux	SOFA initial	IGS2 initial	Issue	Infection secondaire
1	M	76	non	oui	oui	oui	pneumopathie	14	54	favorable	non
2	M	80	non	oui	non	non	péritonite	16	56	favorable	non
3	M	67	Tumeur du cardia	oui	non	oui	médiastinite	14	52	favorable	non
4	M	70	Carcinome colique	oui	non	non	péritonite	18	61	décès (J76)	péritonite tertiaire
5	M	46	non	non	non	non	péritonite	14	45	favorable	non
6	M	57	CE œsophage	non	oui	non	pleurésie purulente	15	51	décès (J11)	aortite infectieuse
7	M	60	non	non	non	non	cellulite dentaire	16	50	favorable	abcès multiples
8	M	70	Cancer vessie	oui	oui	oui	péritonite	17	58	favorable	2° choc septique sur nécrose Bricker
9	F	68	non	non	non	non	médiastinite	14	44	favorable	non
10	F	52	non	non	non	non	péritonite	15	28	favorable	2° choc septique sur péritonite

Tableau 4: Caractéristiques de 10 patients septiques de la biocollection IBIS-sepsis

Nous avons observé chez ces patients, **une profonde lymphopénie T CD4+, persistante pendant plus de 7 jours**, suggérant l'installation d'une **immunodépression post septique**. Concernant les lymphocytes Treg, les résultats varient en fonction de la définition retenue. Nous observons une augmentation de **la co-expression CD4+CD25+** à partir du 4^{ème} jour et du niveau d'expression de **Foxp3+ parmi les lymphocytes CD4+ dès le 1^{er} jour**, mais ces définitions sont imparfaites en contexte inflammatoire. Le ratio CD4+CD25+CD127- et CD4+CD25+CD127-FoxP3+ parmi les lymphocytes CD4+ augmentent chez une partie seulement des patients (**fig.71**).



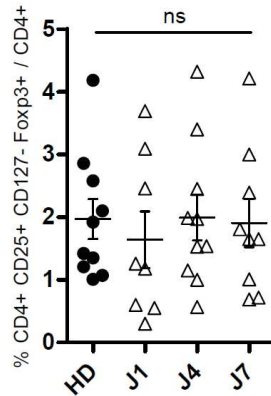
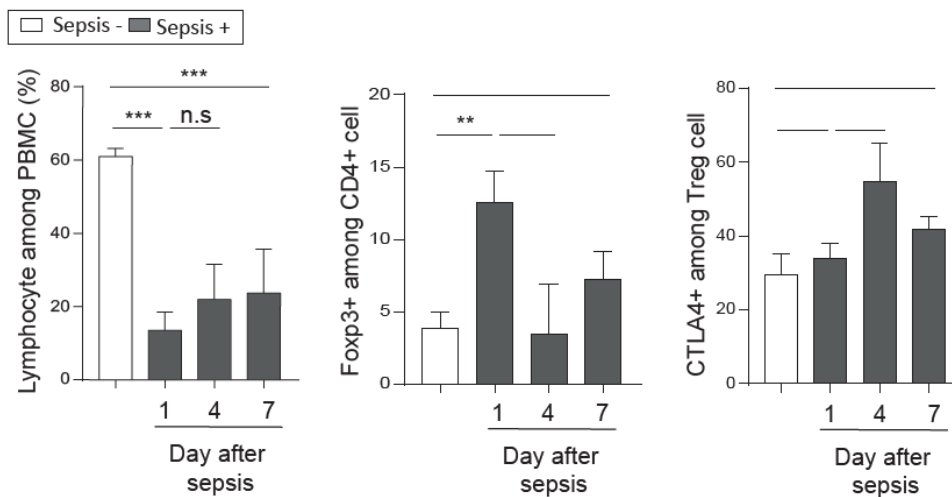


Figure 71 : Analyse du ratio Treg/T CD4+ en fonction des différentes définitions de Treg sur une population prise en charge pour choc septique. Histogrammes représentant les populations de cellules CD4+ CD25+ (panel en haut à gauche), CD4+FoxP3+ (panel en haut au centre) et CD4+CD25+CD127- (panel en haut à droite) et CD4+CD25+CD127-FoxP3+ (panel du bas) exprimées en pourcentage par rapport à la population totale des lymphocytes CD4+. (HD : volontaires sains ; J1 : dans les 48 premières heures du choc septique ; J4 : à J4 du choc septique ; J7 : à J7 du choc septique ; * : $p < 0,05$; ns : non significatif).

Nous n'avons pas observé d'augmentation de **TNFR2** parmi les Treg quel que soit la définition retenue. Nous observons cependant une forte **expression de CTLA4+** parmi les Treg **TNFR2+** en comparaison des Treg **TNFR2-** chez les patients septiques. Comme sur le modèle murin et le modèle de stimulation *ex vivo* des PBMC par le *S. aureus*, nous retrouvons une **induction forte d'expression de CTLA4** avec le sepsis spécifique des Treg **TNFR2+** (Fig.72).



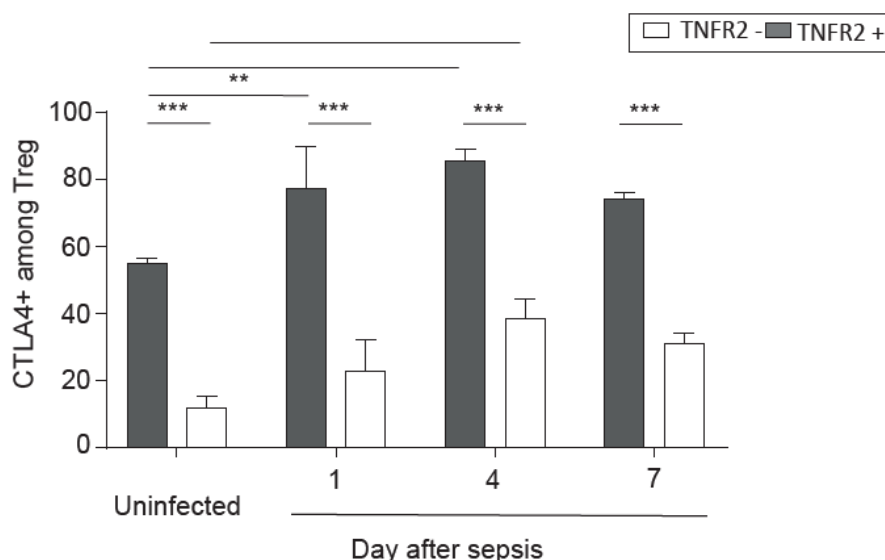


Figure 72: Induction d'expression de CTLA4 spécifique des Treg TNFR2+ chez les patients pris en charge pour choc septique. Histogrammes représentant le pourcentage de lymphocytes CD4+ (panel en haut à gauche), CD4+FoxP3+ (panel en haut au centre) et CD4+CD25+CD127- CTLA4+ (panel en haut à droite) exprimé en pourcentage par rapport aux cellules CD4+ et CD4+CD25+CD127- CTLA4+ en fonction de TNFR2 (panel du bas). (HD : volontaires sains ; J1 : dans les 48 premières heures du choc septique ; J4 : à J4 du choc septique ; J7 : à J7 du choc septique ; * : $p < 0,05$; ns : non significatif).

L'activation et les fonctions inhibitrices des lymphocytes Treg sont principalement localisées dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques).

Ces modifications phénotypiques au cours du sepsis pourraient être représentatives d'une activation des Treg dans les organes lymphoïdes secondaires. Par analyse immunohistochimique d'échantillons de rate de patients (IBIS-cohorte), nous avons observé **une augmentation d'expression de Foxp3+ dans les rates des patients les plus inflammatoires** (patients polytraumatisés ou en état de mort cérébrale) en comparaison de patients non inflammatoires (traumatisme splénique direct) (**Fig.73**).

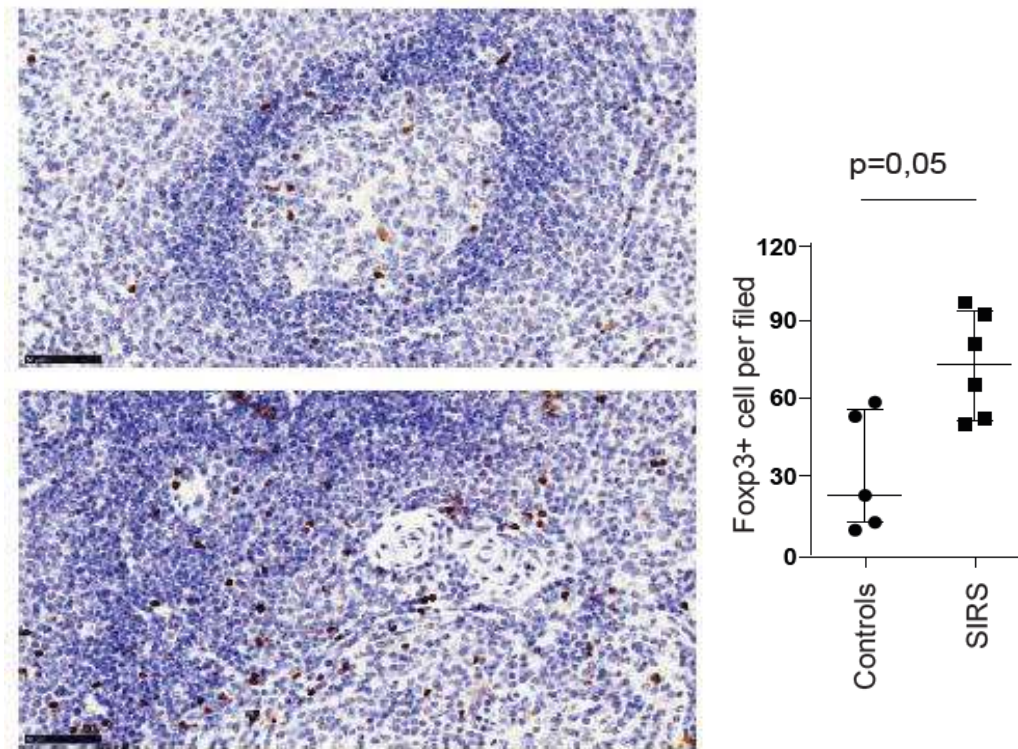


Figure 73: Augmentation d'expression de Foxp3+ dans les rates des patients les plus inflammatoires. Coupes histologiques de tissus spléniques avec marquage immunohistochimique anti-FoxP3+, chez des patients non inflammatoires (control) (n=5) (panel du haut), en comparaison de patients inflammatoires (SIRS) (n=5) (grossissement X40, échelle 50µm). Histogramme du nombre de cellules FoxP3+ splénique dans les groupes correspondants.

Conclusion de la partie 4 :

L'ensemble de ces expériences suggèrent que chez l'homme les Treg TNFR2 au cours du sepsis présentent un profil d'activation avec une augmentation d'expression de CTLA4, associé à une augmentation du taux de lymphocytes Treg splénique. Le blocage du récepteur TNFR2 au cours du sepsis pourrait permettre de restaurer l'IS au cours du sepsis pour limiter les complications de cette IS notamment les infections secondaires.

VI. Discussion et perspectives

Les progrès thérapeutiques de ces 30 dernières années ont permis de diminuer la mortalité secondaire au sepsis, mais ont également fait émerger une nouvelle population de patients « ayant survécu au sepsis ». Ces patients soumis à la phase hyperinflammatoire initiale du sepsis en gardent des séquelles fonctionnelles, organiques mais aussi immunologiques. Certains patients présenteront une cicatrice immunologique, que l'on pourrait apparenter à une immuno- senescence accélérée. Cette « fragilité » immunologique est pourvoyeuse de complications et s'accompagne d'infections secondaires. L'IS post septique est responsable d'une surmortalité, d'une diminution de la qualité de vie des patients et semble associée à une augmentation d'incidence de cancer et de la mortalité cardio-vasculaire globale (Stortz et al., 2018) (Prescott et al., 2016).

Par ailleurs, L'augmentation des niveaux de résistances bactériennes aux antibiotiques à l'échelle mondiale ainsi que la diminution du nombre de nouvelles molécules antibiotiques en développement, ont imposé à la communauté médicale de repenser ses stratégies thérapeutiques. L'épargne antibiotique et la prévention des infections secondaires sont devenues un enjeu de santé publique majeur. Le développement de thérapeutiques immunomodulatrices ciblées au cours du sepsis pourrait permettre d'améliorer le pronostic précoce des patients et de prévenir les infections nosocomiales. Les premiers résultats des essais cliniques évaluant les thérapeutiques ciblées immunostimulantes au cours du sepsis comme les anticorps anti-PD1 et l'IL-7 ont démontrés leur efficacité pour corriger les marqueurs biologiques de l'IS (Hotchkiss et al., 2019) (François et al., 2018).

Les lymphocytes Treg TNFR2 qui sont puissamment immunosuppresseurs, sont de bonnes cibles pour le développement de traitements immunostimulant. Le blocage de la voie TNF α -TNFR2 pourrait permettre de restaurer la réponse immunitaire cellulaire et prévenir ainsi l'IS post septique.

Dans ce contexte nous avons développé un modèle murin afin de pouvoir étudier spécifiquement le rôle de Treg TNFR2 au cours du sepsis. Nos principaux résultats sont que (1) l'atteinte des fonctions lymphocytaires TCD4 effectrices au cours de l'IS précoce post septique est associée à l'activation des Treg ; (2) le sous-ensemble des Treg TNFR2+ est associé à la population de Treg la plus impliquée dans cette IS ; (3) Le blocage spécifique du TNFR2 restaure le nombre et les fonctions des lymphocytes T CD4+ dans notre modèle ; (4) Cette population Treg TNFR2 est impliquée chez les patients de réanimation présentant une IS post septique.

1. Les Treg sont impliqués dans la dysfonction lymphocytaire CD4, au cours l'IS post septique

a. Le sepsis à *S. aureus* induit une IS précoce

S. aureus est l'un des pathogènes les plus fréquemment en cause au cours du sepsis (Martin et al., 2003) (Buetti et al., 2018). Parmi les infections secondaires, la pneumopathie est une infection fréquente en unité de soins intensifs, elle touche environ 30 % des patients dans les suites d'un sepsis (Stortz et al., 2018). Ces infections secondaires sont responsables d'une mortalité, estimée à environ 20% des décès secondaires (Daviaud et al., 2015) (Ibn Saied et al., 2019). Le *P. aeruginosa* est une bactérie opportuniste fréquemment isolée au cours des pneumopathies acquises en réanimation (Torres et al., 2009). La forte consommation d'antibiotique prescrite pour la prise en charge de ces infections nosocomiales contribue à la sélection de germes multirésistants (Boldt et al., 2018). L'immunodépression est un facteur de risque majeur de survenue de pneumopathie au décours du sepsis (Landelle et al., 2010). Une meilleure compréhension des dysfonctions immunitaires induites par le sepsis peut donc permettre de prévenir la survenue d'infections secondaires dont les pneumopathies nosocomiales et ainsi diminuer le taux de résistances bactériennes.

Nous avons développé un modèle d'IS induite par un sepsis à *staphylocoque aureus*. Ce modèle de bactériémie est responsable d'une réponse inflammatoire systémique intense avec une forte expression de TNF α et IL-1 β . Le taux de ces cytokines est rapporté comme fortement corrélé à la sévérité et la mortalité au cours du sepsis sur les modèles murins (Gonçalves et al., 2017) et chez l'homme (Jiménez-Sousa et al., 2017). L'œdème pulmonaire induit par le sepsis dans notre modèle témoigne d'une dysfonction respiratoire (Bellani et al., 2016). Cette défaillance d'organe indique que notre modèle est proche de la définition actuelle du sepsis sévère (Sepsis-3) chez l'homme (Singer et al., 2016).

L'orientation précoce de la réponse immunitaire en réponse à une bactériémie à *S.aureus* est associée au pronostic des patients (Krishack et al., 2019). Une réponse hyperinflammatoire avec une polarisation Th17 chez les patients immunocompétents et une polarisation Treg chez les patients immunodéprimés sont associées à une plus forte mortalité à 3 mois (Greenberg et al., 2018). Notre modèle expérimental permet l'analyse de la phase précoce de la réponse inflammatoire et des mécanismes de mise en place de l'IS précoce.

Le modèle d'IS post septique le plus décrit dans la littérature est celui du sepsis plurimicrobien par péritonite induite par ligature et ponction caecale (CLP) (Shindo et al., 2017b). Ce modèle présente comme avantage d'induire une IS post septique profonde. Cependant il s'agit d'un modèle de sepsis plurimicrobien, dépendant de la flore digestive, du microbiote des souris et pouvant être source de

variabilité entre les équipes de recherche et posant donc le problème de sa reproductibilité. Par ailleurs, l'induction de la péritonite chez la souris nécessite une antibiothérapie à large spectre dont l'impact sur la réponse immunitaire n'est pas spécifiquement évaluée dans ces études (Shen et al., 2019) (Jacqueline et al., 2014).

Dans notre modèle de sepsis sévère, comme dans le modèle de CLP, nous décrivons l'instauration d'une IS dès le 3^{ième} jour de l'infection (Chang et al., 2013b). La procédure expérimentale de notre modèle présente comme avantage en comparaison du modèle de CLP d'être simple avec une excellente reproductibilité.

Les mécanismes impliqués dans l'IS post septique sur notre modèle sont multiples. Les marqueurs permettant de valider l'IS sont (1) une lymphopénie T CD4 et CD8, (2) l'expression de marqueur d'épuisement lymphocytaire (PD1), (3) l'activation des lymphocytes Treg et d'une population de MDSC (données non présentées) (Hotchkiss et al., 2013b). L'originalité de notre travail est d'avoir également utilisé pour la validation de l'IS des marqueurs fonctionnels *in vivo*, (4) le transfert adoptif de lymphocytes OTII comme marqueur fonctionnel de réponse lymphocytaire T (Roquilly et al., 2017) et (5) l'induction d'une pneumopathie bactérienne secondaire permettant de tester les capacités de défenses secondaires au sepsis (afflux des polynucléaires neutrophiles et production cytokinique).

b. La dysfonction du compartiment lymphocytaire prédispose aux infections secondaires

Nous avons analysé les fonctions lymphocytaires effectrices T CD4 dans notre modèle et observé une diminution de lymphocytes T spléniques au 3^{ième} jour du sepsis. Cette lymphopénie globale semble associée à une altération de fonctions, ce dont témoigne la diminution de la prolifération *in vivo* des lymphocytes OTII stimulé par l'ovalbumine. Nous observons une immunodépression caractérisée par une plus forte susceptibilité aux infections secondaires en lien avec une altération profonde des cellules immunitaires innées et adaptatives. La profondeur de la lymphopénie est associée au risque d'infections opportunistes aux cours de l'infection par le VIH, notamment les réactivations virales et parasitaires (Schwarcz et al., 2013). La dysfonction immunitaire au cours de l'IS post septique est complexe. Elle associe une dysfonction du système immunitaire inné et adaptatif expliquant la survenue plus fréquente d'infections bactériennes opportunistes qu'au cours du VIH. Le lien entre immunité innée et adaptative au cours de l'IS post septique est peu décrit *in vivo*. Dans notre modèle, l'induction d'une pneumopathie à *P. aeruginosa* dans les suites du sepsis, s'accompagne d'une plus forte sévérité en comparaison d'une pneumopathie seule et est associée à une baisse de l'afflux de polynucléaires neutrophiles et des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β). Gupta et al. ont montré une augmentation des lymphocytes Treg et une altération de la voie Th1 significative dans un

population de patients pris en charge pour état de choc septique (Gupta et al., 2016). Nos travaux suggèrent que la dysfonction combinée des compartiments immunitaires innés (baisse de l'afflux des polynucléaires neutrophiles et des cytokines pro-inflammatoires) et lymphocytaires T aggrave la sévérité de l'infection pulmonaire secondaire bactérienne à *P. aeruginosa*. La réversibilité des anomalies lymphocytaires et neutrophiliques après déplétion des Treg ou le traitement par anti-TNFR2 ne permet cependant pas de préjuger du lien de causalité direct entre dysfonction lymphocytaire et dysfonction du système immunitaire inné.

2. Le Treg effecteur, un acteur central de l'IS post sepsis

Dans notre modèle de sepsis murin les lymphocytes Treg spléniques présentent un phénotype d'activation caractérisé par (1) **une augmentation du ratio Treg/Tconv**, (2) **une signature transcriptomique proche de celle des Treg effecteurs**, (3) **une forte expression des CTLA4**. Enfin, la déplétion des Treg permet (4) **de restaurer le nombre et la fonction des lymphocytes T CD4+FoxP3-** (capacité de prolifération et marqueurs phénotypiques dont du PD1 et du CD25).

Le rôle inhibiteur des lymphocytes Treg sur les fonctions lymphocytaires CD4 effectrices est déjà bien connu. Koch et al. ont démontré dans un modèle murin d'infection à *Mycobacterium tuberculosis* (Koch et al., 2009), que l'INF γ , par l'activation du facteur de transcription T-bet induisait l'expression du récepteur CXCR3 dans une population de Treg in vivo. Cette population CXCR3 Treg exerce un pouvoir immunosuppresseur spécifique sur les lymphocytes Th1. Dans un modèle de CLP, il a été démontré que l'inactivation de FoxP3 par l'utilisation de siRNA permettait de restaurer la lymphoprolifération (Venet et al., 2009).

La déplétion spécifique de la population Treg à la phase initiale du sepsis par l'utilisation de souris DREG nous a permis de restaurer les capacités de réponse pro-inflammatoire, notamment de prolifération lymphocytaire T spécifique d'antigène mais également d'afflux de polynucléaires neutrophiles. Il est possible que la restauration des capacités immunitaires de la souris lors de la déplétion des Treg soit médiée par une action combinée de levée d'inhibition lymphocytaire et d'activation des cellules présentatrices d'antigènes en l'absence des Treg. Dans notre modèle, l'analyse transcriptomique des Treg septiques révèle un profil d'activation associé à une surexpression de CXCR3, de T-bet, Blimp-1, Irf4, ROR γ T pouvant suggérer la présence parmi cette population de Treg, des eTreg dirigés spécifiquement contre la réponse Th1, Th2 et Th17.

Nos résultats suggèrent un rôle précoce des Treg dans le mécanisme de rétrocontrôle négatif sur les fonctions immunitaires innées et adaptatives au cours d'un sepsis sévère.

FoxP3 est un facteur de transcription nucléaire essentiel aux fonctions des Treg, cependant son expression ne préjuge pas à lui seul du niveau d'activation des Treg (Wing et al., 2019). D'autres marqueurs phénotypiques permettent de mieux caractériser leur état d'activation et leurs spécificités fonctionnelles. L'expression de CTLA4 par les Treg est rapportée au cours du paludisme, ou l'induction du CTLA4+ est associée à leurs fonctions inhibitrices (Bueno et al., 2010). Le CTLA4 est un co-récepteur inhibiteur, capable de se fixer avec une forte affinité au CD80 et au CD86. Il bloque ainsi de manière compétitive le co-signal positif entre d'un côté le CD28 lymphocytaire et de l'autre CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2), nécessaires à l'activation des lymphocytes T CD4. Il s'agit de l'un de ces mécanismes d'action pouvant conduire à l'anergie des lymphocytes T CD4 (Belkaid et al., 2002). Nous avons observé avec le sepsis de manière associée à l'expression de CTLA4 une augmentation d'expression du CD25, un récepteur essentiel à l'activation et à la stabilité fonctionnelle des Treg. D'autres marqueur comme IKzf4 (HELIOS), Blimp-1, IL-10 ou encore la faible expression de CD62L suggèrent que les Treg activés dans notre modèle sont très majoritairement des Treg thymiques activés (Kallies and Nutt, 2007).

Le rôle des Treg au cours du sepsis reste controversé, certains auteurs rapportent leur rôle protecteur (Hein et al., 2010) et d'autre délétère (Nascimento et al., 2017). L'un des éléments de réponse est probablement le manque de stratification des patients dans ces études. En effet, l'activation des Treg est une réponse précoce adaptée à la réponse pro-inflammatoire. Ainsi, au temps précoce du sepsis, la majeure part de la mortalité est secondaire aux processus pro-inflammatoires excessifs (Daviaud et al., 2015). Les Treg par leurs fonctions inhibitrices puissantes ont démontré leur rôle protecteur sur la mortalité des modèles de choc induit par le LPS (van Mierlo et al., 2008), par le zymozan (Jia et al., 2013), et dans la maladie du greffon contre l'hôte (Salomon et al., 2018). Dans notre modèle murin, la déplétion précoce des Treg s'accompagne également de manifestations pro-inflammatoires plus marquées que chez les souris septiques avec Treg activés.

L'activation persistante et inappropriée des Treg participe à l'IS post septique et explique leur association au pronostic plus péjoratif décrit par d'autres (Greenberg et al., 2018) (Minigo et al., 2009). En effet, contrairement aux lymphocytes T conventionnels, les Treg semblent mieux résister à l'apoptose en contexte inflammatoire, notamment par l'expression de facteur anti-apoptotique de la famille de Bcl-2, comme cela a déjà été décrit au cours des modèle de CLP (Luan et al., 2015). Ainsi, la persistance des Treg, et l'augmentation du ratio Treg/CD4 paraît un bon critère de suivi de l'IS.

L'analyse par RNAseq a révélé l'expression de transcrits de nombreux membres de la famille du récepteur du TNF α et de la voie NF κ B. Cela, suggère le rôle important du TNF α dans l'activation des Treg. Parmi, les membres de cette famille, le TNFR2 est fortement exprimé. Le TNFR2 est décrit comme étant associé au sous type de Treg le plus immunosuppresseur (Chen et al., 2013).

3. Le récepteur TNFR2 est associé à l'activation des Treg au cours du sepsis

a. Le TNFR2 un marqueur associé aux Treg les plus immunosuppresseurs

Dans notre modèle murin, l'augmentation d'expression du CTLA4 est associée à l'expression de TNFR2 sur les Treg. Les Treg humains stimulés par du TNF α en présence d'IL-2, expriment un phénotype d'activation caractérisé par une augmentation de leur niveau d'expression du CD25 et de FoxP3 et un plus fort pouvoir inhibiteur (Zaragoza et al., 2016). Par ailleurs, les Treg les plus puissamment immunosuppresseurs chez l'homme (Chen et al., 2010b) et la souris (Chen et al., 2008) sont les Treg TNFR2. Dans notre travail, l'analyse de leurs profils d'expression transcriptomique a confirmé que les Treg TNFR2 présentaient un profil de Treg effecteur. Par ailleurs, dans les souris TNFR2KO, les Treg ne présentaient plus l'augmentation d'expression du CTLA4 en condition de sepsis. Cela suggère le rôle majeur du TNFR2 dans ce mécanisme. Oppenheim et son équipe ont été les premiers à démontrer les capacités fortement immuno-suppressives des Treg TNFR2 chez la souris (Chen et al., 2008). Depuis de nombreux travaux ont confirmé que le sous type des Treg TNFR2 étaient le plus puissant inhibiteur au cours du cancer (Torrey et al., 2017) ou encore des leucémies (Govindaraj et al., 2014).

b. Le récepteur TNFR2 est associé à l'activation de la voie IL2/STAT5 au cours du sepsis

L'analyse des profils transcriptomiques des Treg et Treg TNFR2 au cours du sepsis suggèrent l'implication des voies d'activation IL2/STAT5 et mTOR dans l'activation de ces populations. L'augmentation d'expression du CD25 chez les Treg TNFR2 des souris est également retrouvé chez l'homme et renforce l'idée que la stabilisation des Treg TNFR2 est en lien avec ces voies d'activations.

La voie IL2/STAT 5 est une voie d'activation des Treg déjà décrite dans des modèles murins IL2 (-/-) (Burchill et al., 2007) (Mahmud et al., 2013). Chen et al. ont démontré que l'IL-2 était associée à la phosphorylation de STAT5 et la maturation des Treg (Cheng et al., 2013). Par ailleurs, il est rapporté chez les souris TNFR2KO, une baisse spontanée de la fréquence des Treg ainsi que leur expression de STAT 5 (Chen et al., 2007) (Yu et al., 2009).

Ces résultats suggèrent que la signalisation TNFR2 par la fixation du TNF membranaire, contribue avec le co-signal de l'IL-2 sur le CD25 à la phosphorylation de STAT5 (Burchill et al., 2007) et à la stabilisé de l'expression de Foxp3.

Chez l'homme l'utilisation d'agonistes du TNF α (Okubo et al., 2016) et d'agonistes TNFR2 (He et al., 2016) permet d'induire ex vivo la production de Treg. *In vitro*, les anti-TNFR2 ont démontré leur capacité à inhiber les Treg TNFR2 et à restaurer un ratio Treg/ Teff favorable à partir de lymphocytes de patients suivis pour lymphome de sezary (Torrey et al., 2018).

c. Implication du TNFR2 en dehors des Treg

Le TNFR2 est majoritairement exprimé par les cellules immunitaires, neuronales et endothéliales. Comme l'a décrit Chen (Chen et al., 2010b), nous observons dans le modèle murin une co-expression de TNFR2 et FoxP3 chez la souris en condition physiologique mais également en contexte de sepsis.

Au cours du sepsis murin, nous observons également l'expression de TNFR2 dans une population de lymphocytes T CD4 non FoxP3 dans des proportions bien inférieures à celle des Treg (Chen et al., 2010a). Dans un modèle murin de tumeur pulmonaire, ces lymphocytes TCD4 Foxp3-TNFR2+, ne présentaient pas de fonctions suppressives. Ils exprimaient des marqueurs d'activation comme le Ki67 et une résistance marquée à l'action inhibitrice des Treg. Le TNFR2 exprimé par les lymphocytes T CD4 non Treg semble associé à la prolifération lymphocytaire, à la polarisation vers la voie Th1, à la production d'INF γ (Xu et al., 2017) et à l'inhibition de la voie Th17 (Miller et al., 2015). L'utilisation d'antagonistes spécifiques du TNFR2 pourrait inhiber de manière directe les lymphocytes T effecteurs. Il pourrait s'agir d'une explication à la plus faible prolifération des lymphocytes OTII dans notre modèle lors de l'utilisation des anti-TNFR2 au cours du sepsis.

Nous ne nous pouvons néanmoins exclure le fait qu'une partie de nos résultats puisse être secondaire à l'activité du TNFR2 sur d'autres cellules que les Treg.

Les monocytes expriment également le TNFR1 et TNFR2 (Rossol et al., 2007), leurs fonctions sur ces cellules sont peu décrites (Venkatesh et al., 2013).

Les neutrophiles (Kilpatrick et al., 2006) et les cellules dendritiques expriment également le TNFR2 (Martin et al., 2014). L'activation du TNFR2 par le TNF α serait associée à la production d'IL-12 et favoriserait la différenciation Th1 et la réponse inflammatoire.

Concernant les lymphocytes CD8 le rôle du TNFR2 est controversé. Ses fonctions activatrices, sur la survie et la prolifération lymphocytaire CD8 ont été décrites (Kim et al., 2006). Dans un modèle de colite, l'activation du TNFR2 s'accompagnait d'une baisse d'activité des lymphocytes CD8 (Punit et al., 2015).

4. Les Treg au cours du choc septique chez l'homme

a. Définitions controversées des populations Treg au cours du choc septique chez l'homme

La définition phénotypique des lymphocytes Treg chez l'homme est plus difficile que dans un modèle murin. La définition des Treg par le co-marquage CD4+FoxP3+, n'est pas suffisamment sélective chez

l'homme. Nous avons analysé les prélèvements de patients pris en charge pour un choc septique (PBMC) issus d'une biocollection (IBIS-sepsis). Nous avons constaté l'apparition rapide d'une lymphopénie profonde CD4 et CD8, associée à une activation des lymphocytes Treg TNFR2 (CD4+CD25+CD127- Foxp3+) exprimant fortement du CTLA4+.

La persistance de la lymphopénie au cours du sepsis (Le Tulzo et al., 2002) après le 4^{ème} jours constitue un marqueur robuste de l'IS post septique qui est corrélé à la survenue d'infections secondaires et à la mortalité (Hotchkiss et al., 2001b; Roth et al., 2003b; Venet et al., 2010b). Cette lymphopénie persistante constitue un premier biomarqueur témoignant de l'instauration d'une IS post septique chez les patients de la cohorte. Les données de suivi clinique chez ces patients confirment l'existence d'une dysfonction immunitaire secondaire (IS) avec un taux d'infection secondaire et une évolution clinique défavorable dans près de 50% des cas.

Comme dans notre modèle murin, nous observons une forte expression du CTLA4 chez les Treg TNFR2. La co-expression du CTLA4 et du TNFR2 chez les Treg suggère le rôle activateur du TNF α sur le récepteur TNFR2 des Treg (Chen et al., 2010c) (Friedline *et al.*, 2009; Walker, 2013).

Nous avons observé l'augmentation rapide de l'expression de Foxp3 parmi les lymphocytes CD4+ et du pourcentage des lymphocytes CD4+CD25+ parmi les CD4+. Ce qui a déjà été rapporté sur des populations comparables de patients en sepsis (Monneret et al., 2003) (Li et al., 2015). Le pourcentage de lymphocytes T CD4+CD25+CD127- utilisé dans d'autres études (Tatura et al., 2012) (Hein et al., 2010) est également augmenté au cours du sepsis mais de manière non significative.

L'une des principales difficultés à l'identification de la population Treg est l'absence de marqueurs phénotypiques spécifiques consensuels et de corrélation avec une activité suppressive *in vivo*. Environ 25% des lymphocytes T CD4+ expriment CD25, mais seul 1 à 2 % de ces cellules (celles exprimant le plus fortement CD25) ont une activité suppressive. Au contraire, certaines cellules CD4+FoxP3+ sont CD25-, et certaines cellules T effectrices activées expriment fortement du CD25 (Baecher-Allan et al., 2001b, 2002b; Seddiki et al., 2006b). Les mêmes limites existent avec l'expression de CD127, seuls 40% des CD4+CD127- expriment Foxp3+, les autres cellules étant non suppressives (Shevach, 2006b). Dans le contexte de rhumatisme inflammatoire chronique, les Treg définis comme CD4+CD25+CD127- n'exprimaient pas tous le FoxP3, certaines de ces cellules n'ayant aucune activité suppressive (Aerts et al., 2008b). Enfin, le facteur de transcription nucléaire FoxP3, dont le rôle primordial a été clairement démontré dans l'activité suppressive des Treg chez la souris, peut chez l'Homme être exprimé par les lymphocytes T effecteurs activés. Le marqueur Foxp3 chez l'homme peut donc également manquer de spécificité (Allan et al., 2007b). Il est ainsi difficile d'isoler sur des critères phénotypiques une population Treg homogène définie par ses capacités fonctionnelles.

L'utilisation d'une définition phénotypique plus restrictive des Treg par le co-marquage CD4+CD25+CD127-FoxP3+ ne nous n'a pas permis de constater d'augmentation du pourcentage de Treg par rapport à la population CD4+ aux différents temps du sepsis. Cependant, l'ensemble des patients étudiés ne présenteront pas une IS post septique profonde. Le choix de marqueurs phénotypiques de la population de Treg conduit à analyser des populations cellulaires hétérogènes, plus ou moins enrichies en Treg. La définition phénotypique choisie devant être suffisamment restrictive pour identifier les patients immunodéprimés. Le suivi du niveau d'expression du CTLA4 par les Treg (CD4+CD25+CD127-FoxP3+) pourrait constituer un marqueur d'IS pertinent qu'il reste à évaluer sur une plus grande cohorte de patients.

Comme Chen *et al.* l'avaient déjà mis en évidence nous observons chez les Treg TNFR2+ , une forte expression du CTLA4, faisant présumer d'une plus grande activité suppressive chez les Treg TNFR2 chez nos patients (Chen et al., 2010c).

Nous rapportons également une nette augmentation de l'expression du CTLA4 chez les Treg TNFR2 sur les PBMC stimulés *ex vivo* par le *S. aureus* ainsi que chez les patients au 4^{ème} jour du sepsis. Les études dans des modèles murins de sepsis bactériens et fongiques, ont démontré l'effet protecteur de l'administration d'anticorps bloquant anti-CTLA4 sur la mortalité au cours de l'IS post septique (Inoue et al., 2011; Chang et al., 2013c).

Plusieurs travaux ont rapporté une augmentation de l'expression de TNFR2 par les Treg en contexte inflammatoire. Il s'agissait principalement d'inflammation chronique comme la polyarthrite rhumatoïde ou de pathologies carcinologiques répondant à des mécanismes d'échappement immunitaire plus prolongé (Torrey et al., 2017). La population des Treg TNFR2 au cours du sepsis ne semble pas majoritaire dans le sang circulant, mais l'expression du CTLA4 par ces Treg suggère qu'il s'agit d'une population activée au fort pouvoir inhibiteur.

L'activation des Treg TNFR2 s'effectue dans les centres lymphatiques secondaires (rate, centre lymphatique secondaires). L'analyse de prélèvements spléniques de patients en état hyperinflammatoire nous suggère l'activation de population Treg splénique.

5. Perspectives

Nous poursuivons actuellement l'analyse des fonctions des Treg TNFR2 au cours du sepsis à partir de la biocollection de patients pris en charge pour choc septique. Nous étudions notamment le pouvoir inhibiteur des Treg TNFR2 sur la prolifération de lymphocytes T effecteurs stimulés en comparaison des Treg de donneurs sains. L'analyse du degré de méthylation des promoteurs du gène Foxp3 par pyroséquencage pourraient nous permettre de mieux décrire les fonctionnalités de cette population.

Notre objectif est de mieux comprendre le mode d'activation précoce des Treg TNFR2 et d'évaluer les effets du blocage de la voie TNFR2 en prévention de l'IS post septique.

Les perspectives apportées par ces résultats sont multiples, l'utilisation des Treg TNFR2 comme marqueur d'IS nécessitera l'analyse de cette population Treg sur un plus large panel de patients. Il sera nécessaire de rechercher une corrélation avec la survenue de l'IS post septique, les infections secondaires, les réactivations virales et le devenir des patients. Cette population lymphocytaire constitue un marqueur phénotypique simple et pragmatique utilisable en pratique clinique pour identifier les patients les plus immunodéprimés par le sepsis. Les Treg TNFR2 CTLA4 pourrait s'intégrer dans un panel diagnostique de l'IS post septique.

La validation de notre modèle murin va nous permettre d'analyser également les répercussions à plus long terme de cette IS sur notre modèle, notamment sur la survenue de cancer. Nous étudions actuellement l'analyse de la dissémination du mélanome au cours de l'IS tardive induite par le sepsis sur notre modèle. L'IS semble associée à une plus grande dissémination pulmonaire du mélanome. Cette cicatrice immunologique est encore peu étudiée au décours du sepsis. En parallèle, nous avons comme projet d'élargir notre biocollection pour analyser l'impact de l'IS médiée par les Treg TNFR2 sur le devenir d'une population prise en charge pour endocardite à *S.aureus* au CHU de Nantes (associée à une cohorte clinique prospective déjà existante (Raphaël et al., 2019).

Notre modèle d'IS permettra également l'analyse du rôle respectif des voies effectrices des Treg, identifiées dans ce travail (granzymes, IL-10, CTLA4) dans l'induction de l'immunosuppression sur les différents compartiments immunitaires. Il peut permettre également de mieux comprendre le rôle des Treg TNFR2- dans le contrôle de l'inflammation et leur implication en comparaison des Treg TNFR2+.

VII. CONCLUSION

Nos données suggèrent que l'activation des Treg TNFR2 au cours du sepsis participe à l'instauration d'une IS post septique et favorise notamment l'altération des fonctions lymphocytaires T CD4+ effecteurs. Les Treg pourraient donc participer à la survenue d'infections secondaires (**Fig.74**). L'expression restreinte de TNFR2 sur les Treg en font une cible idéale pour le développement de thérapies ciblées. L'utilisation des Treg TNFR2 comme marqueur diagnostique de l'IS post septique et comme critère d'initiation d'un traitement par anti-TNFR2 semble également une piste prometteuse.

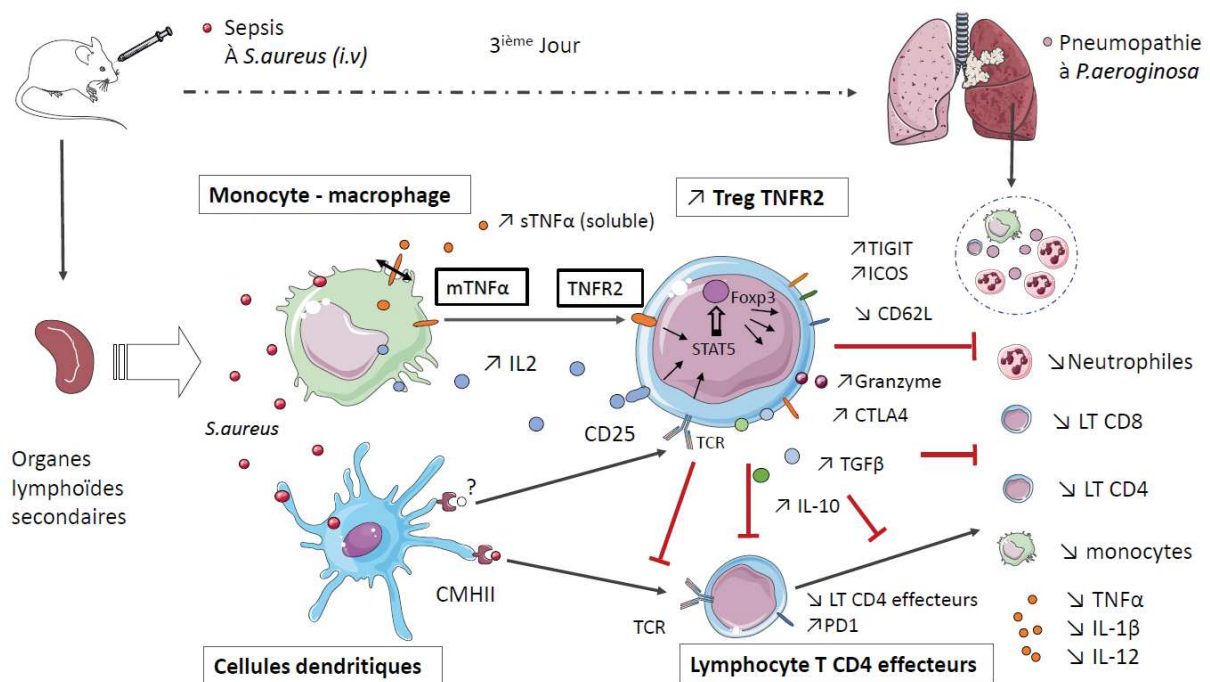


Figure 74 : Hypothèse de travail sur le rôle des lymphocytes Treg TNFR2 au cours du sepsis.

VIII. REFERENCES

- Abdel-Rahman, O., ElHalawani, H., and Fouad, M. (2016). Risk of endocrine complications in cancer patients treated with immune check point inhibitors: a meta-analysis. *Future Oncol. Lond. Engl.* *12*, 413–425.
- Aerts, N.E., Dombrecht, E.J., Ebo, D.G., Bridts, C.H., Stevens, W.J., and De Clerck, L.S. (2008a). Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.* *251*, 109–115.
- Aerts, N.E., Dombrecht, E.J., Ebo, D.G., Bridts, C.H., Stevens, W.J., and De Clerck, L.S. (2008b). Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.* *251*, 109–115.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 745–756.
- Aggarwal, B.B., Moffat, B., and Harkins, R.N. (1984). Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.* *259*, 686–691.
- Airas, L., Hellman, J., Salmi, M., Bono, P., Puurunen, T., Smith, D.J., and Jalkanen, S. (1995). CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J. Exp. Med.* *182*, 1603–1608.
- Akkaya, B., Oya, Y., Akkaya, M., Al Souz, J., Holstein, A.H., Kamenyeva, O., Kabat, J., Matsumura, R., Dorward, D.W., Glass, D.D., et al. (2019). Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nat. Immunol.* *20*, 218–231.
- Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., and Levings, M.K. (2007a). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* *19*, 345–354.
- Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., and Levings, M.K. (2007b). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* *19*, 345–354.
- van Amelsfort, J.M.R., Jacobs, K.M.G., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.P.J.G., and Taams, L.S. (2004). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* *50*, 2775–2785.
- Andersson, J., Tran, D.Q., Pesu, M., Davidson, T.S., Ramsey, H., O’Shea, J.J., and Shevach, E.M. (2008). CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* *205*, 1975–1981.
- Angus, D.C., and van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* *369*, 840–851.
- Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M.R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* *29*, 1303–1310.

- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T.C., Cumano, A., and Bandeira, A. (2001). CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 3008–3018.
- Annane, D., Renault, A., Brun-Buisson, C., Megarbane, B., Quenot, J.-P., Siami, S., Cariou, A., Forceville, X., Schwebel, C., Martin, C., et al. (2018). Hydrocortisone plus Fludrocortisone for Adults with Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* *378*, 809–818.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., and Romagnani, S. (2002). Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J. Exp. Med.* *196*, 379–387.
- Apetoh, L., Quintana, F.J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E.J., Sherr, D.H., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2010). The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* *11*, 854–861.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* *3*, 756–763.
- Astier, A.L., Meiffren, G., Freeman, S., and Hafler, D.A. (2006). Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *116*, 3252–3257.
- Astiz, M., Saha, D., Lustbader, D., Lin, R., and Rackow, E. (1996). Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J. Lab. Clin. Med.* *128*, 594–600.
- Atarashi, K., Umesaki, Y., and Honda, K. (2011). Microbiotal influence on T cell subset development. *Semin. Immunol.* *23*, 146–153.
- Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P.S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1380–1389.
- Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001a). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 1245–1253.
- Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001b). CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J. Immunol.* *167*, 1245–1253.
- Baecher-Allan, C., Viglietta, V., and Hafler, D.A. (2002a). Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 6210–6217.
- Baecher-Allan, C., Viglietta, V., and Hafler, D.A. (2002b). Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 6210–6217.
- Baeyens, A., Saadoun, D., Billiard, F., Rouers, A., Grégoire, S., Zaragoza, B., Grinberg-Bleyer, Y., Marodon, G., Piaggio, E., and Salomon, B.L. (2015). Effector T cells boost regulatory T cell expansion by IL-2, TNF, OX40, and plasmacytoid dendritic cells depending on the immune context. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 999–1010.
- Belkaid, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 875–888.

Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., and Sacks, D.L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502–507.

Bellani, G., Laffey, J.G., Pham, T., Fan, E., Brochard, L., Esteban, A., Gattinoni, L., van Haren, F., Larsson, A., McAuley, D.F., et al. (2016). Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* 315, 788–800.

Benjamim, C.F., Lundy, S.K., Lukacs, N.W., Hogaboam, C.M., and Kunkel, S.L. (2005). Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* 105, 3588–3595.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20–21.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.

Beutler, B., and Cerami, A. (1989). The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 625–655.

Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.C., Mathison, J., Ulevitch, R., and Cerami, A. (1985). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316, 552–554.

Bierhaus, A., and Nawroth, P.P. (2003). Modulation of the vascular endothelium during infection--the role of NF-kappa B activation. *Contrib. Microbiol.* 10, 86–105.

Biswas, S.K., and Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 30, 475–487.

Biton, J., Semerano, L., Delavallée, L., Lemeiter, D., Laborie, M., Grouard-Vogel, G., Boissier, M.-C., and Bessis, N. (2011). Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 3899–3910.

Boldt, A.-C., Schwab, F., Rohde, A.M., Kola, A., Bui, M.T., Martin, N., Kipnis, M., Schröder, C., Leistner, R., Wiese-Posselt, M., et al. (2018). Admission prevalence of colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae and subsequent infection rates in a German university hospital. *PloS One* 13, e0201548.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (1992). DEfinitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. the accp/sccm consensus conference committee. american college of chest physicians/society of critical care medicine. *CHEST J.* 101, 1644–1655.

Boomer, J.S., To, K., Chang, K.C., Takasu, O., Osborne, D.F., Walton, A.H., Bricker, T.L., Jarman, S.D., 2nd, Kreisel, D., Krupnick, A.S., et al. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 306, 2594–2605.

Boomer, J.S., Shuherk-Shaffer, J., Hotchkiss, R.S., and Green, J.M. (2012). A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 16, R112.

- Brahmamdam, P., Inoue, S., Unsinger, J., Chang, K.C., McDunn, J.E., and Hotchkiss, R.S. (2010). Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 88, 233–240.
- Brun-Buisson, C., Doyon, F., Carlet, J., Dellamonica, P., Gouin, F., Lepoutre, A., Mercier, J.C., Offenstadt, G., and Régnier, B. (1995). Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 274, 968–974.
- Buckner, J.H., and Ziegler, S.F. (2008). Functional analysis of FOXP3. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143, 151–169.
- Bueno, L.L., Morais, C.G., Araújo, F.F., Gomes, J.A.S., Corrêa-Oliveira, R., Soares, I.S., Lacerda, M.V., Fujiwara, R.T., and Braga, E.M. (2010). *Plasmodium vivax*: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PloS One* 5, e9623.
- Buetti, N., Lo Priore, E., Sommerstein, R., Atkinson, A., Kronenberg, A., Marschall, J., and Swiss Centre for Antibiotic resistance (ANRESIS) (2018). Epidemiology of subsequent bloodstream infections in the ICU. *Crit. Care Lond. Engl.* 22, 259.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 280–290.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.-W.J., Vegoe, A.L., Hsieh, C.-S., Jenkins, M.K., and Farrar, M.A. (2008). Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28, 112–121.
- Burgler, S., Mantel, P.-Y., Bassin, C., Ouaked, N., Akdis, C.A., and Schmidt-Weber, C.B. (2010). RORC2 is involved in T cell polarization through interaction with the FOXP3 promoter. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 6161–6169.
- Burnham, K.L., Davenport, E.E., Radhakrishnan, J., Humburg, P., Gordon, A.C., Hutton, P., Svoren-Jabalera, E., Garrard, C., Hill, A.V.S., Hinds, C.J., et al. (2017). Shared and Distinct Aspects of the Sepsis Transcriptomic Response to Fecal Peritonitis and Pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 196, 328–339.
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635–646.
- Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2007). Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 179–185.
- Carson, W.F., Cavassani, K.A., Ito, T., Schaller, M., Ishii, M., Dou, Y., and Kunkel, S.L. (2010). Impaired CD4+ T-cell proliferation and effector function correlates with repressive histone methylation events in a mouse model of severe sepsis. *Eur. J. Immunol.* 40, 998–1010.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3666–3670.

- Cavaillon, J.-M., and Adib-Conquy, M. (2006). Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* *10*, 233.
- Cavassani, K.A., Carson, W.F., Moreira, A.P., Wen, H., Schaller, M.A., Ishii, M., Lindell, D.M., Dou, Y., Lukacs, N.W., Keshamouni, V.G., et al. (2010). The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood* *115*, 4403–4411.
- Chang, K.C., Burnham, C.-A., Compton, S.M., Rasche, D.P., Mazuski, R.J., McDonough, J.S., Unsinger, J., Korman, A.J., Green, J.M., and Hotchkiss, R.S. (2013a). Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* *17*, R85.
- Chang, K.C., Burnham, C.-A., Compton, S.M., Rasche, D.P., Mazuski, R., Smcdonough, J., Unsinger, J., Korman, A.J., Green, J.M., and Hotchkiss, R.S. (2013b). Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* *17*, R85.
- Chang, K.C., Burnham, C.-A., Compton, S.M., Rasche, D.P., Mazuski, R., SMcDonough, J., Unsinger, J., Korman, A.J., Green, J.M., and Hotchkiss, R.S. (2013c). Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care* *17*, R85.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* *326*, 986–991.
- Chen, X., and Oppenheim, J.J. (2010). TNF- α : an activator of CD4⁺FoxP3⁺TNFR2⁺ regulatory T cells. *Curr. Dir. Autoimmun.* *11*, 119–134.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Chen, X., Bäümel, M., Männel, D.N., Howard, O.M.Z., and Oppenheim, J.J. (2007). Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *179*, 154–161.
- Chen, X., Subleski, J.J., Kopf, H., Howard, O.M.Z., Männel, D.N., and Oppenheim, J.J. (2008). Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *180*, 6467–6471.
- Chen, X., Hamano, R., Subleski, J.J., Hurwitz, A.A., Howard, O.M.Z., and Oppenheim, J.J. (2010a). Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4⁺FoxP3⁻ conventional T cells to suppression by CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *185*, 174–182.
- Chen, X., Subleski, J.J., Hamano, R., Howard, O.M.Z., Wilttrout, R.H., and Oppenheim, J.J. (2010b). Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1099–1106.
- Chen, X., Subleski, J.J., Hamano, R., Howard, O.M.Z., Wilttrout, R.H., and Oppenheim, J.J. (2010c). Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1099–1106.

- Chen, X., Wu, X., Zhou, Q., Howard, O.M.Z., Netea, M.G., and Oppenheim, J.J. (2013). TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 1076–1084.
- Cheng, G., Yu, A., Dee, M.J., and Malek, T.R. (2013). IL-2R signaling is essential for functional maturation of regulatory T cells during thymic development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 1567–1575.
- Chiche, L., Forel, J.-M., Thomas, G., Farnarier, C., Cognet, C., Guervilly, C., Zandotti, C., Vély, F., Roch, A., Vivier, E., et al. (2012). Interferon- γ production by natural killer cells and cytomegalovirus in critically ill patients. *Crit. Care Med.* **40**, 3162–3169.
- Chinen, T., Kannan, A.K., Levine, A.G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* **17**, 1322–1333.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* **17**, 983–988.
- Churpek, M.M., Zdravetz, F.J., Winslow, C., Howell, M.D., and Edelson, D.P. (2015). Incidence and Prognostic Value of the Systemic Inflammatory Response Syndrome and Organ Dysfunctions in Ward Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **192**, 958–964.
- Cobbold, S.P. (2009). Future therapeutics for the induction of peripheral immune tolerance in autoimmune disease and organ transplantation. *Immunotherapy* **1**, 447–460.
- Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann. Surg.* **14**, 199–220.
- Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J.C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., van der Merwe, P.A., and Davis, S.J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* **17**, 201–210.
- Condotta, S.A., Cabrera-Perez, J., Badovinac, V.P., and Griffith, T.S. (2013). T-cell-mediated immunity and the role of TRAIL in sepsis-induced immunosuppression. *Crit. Rev. Immunol.* **33**, 23–40.
- Condotta, S.A., Khan, S.H., Rai, D., Griffith, T.S., and Badovinac, V.P. (2015). Polymicrobial Sepsis Increases Susceptibility to Chronic Viral Infection and Exacerbates CD8+ T Cell Exhaustion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195**, 116–125.
- Conway Morris, A., Datta, D., Shankar-Hari, M., Stephen, J., Weir, C.J., Rennie, J., Antonelli, J., Bateman, A., Warner, N., Judge, K., et al. (2018). Cell-surface signatures of immune dysfunction risk-stratify critically ill patients: INFECT study. *Intensive Care Med.* **44**, 627–635.
- Cozzo, C., Larkin, J., and Caton, A.J. (2003). Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 5678–5682.
- Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., et al. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **12**, 304–311.
- Cretney, E., Kallies, A., and Nutt, S.L. (2013). Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol.* **34**, 74–80.

- Davenport, E.E., Burnham, K.L., Radhakrishnan, J., Humburg, P., Hutton, P., Mills, T.C., Rautanen, A., Gordon, A.C., Garrard, C., Hill, A.V.S., et al. (2016). Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* 4, 259–271.
- Daviaud, F., Grimaldi, D., Dechartres, A., Charpentier, J., Geri, G., Marin, N., Chiche, J.-D., Cariou, A., Mira, J.-P., and Pène, F. (2015). Timing and causes of death in septic shock. *Ann. Intensive Care* 5, 16.
- De, A.K., Kodys, K.M., Pellegrini, J., Yeh, B., Furse, R.K., Bankey, P., and Miller-Graziano, C.L. (2000). Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 96, 52–66.
- De Wilde, V., Van Rompaey, N., Hill, M., Lebrun, J.F., Lemaître, P., Lhommé, F., Kubjak, C., Vokaer, B., Oldenhove, G., Charbonnier, L.M., et al. (2009). Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 2034–2047.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204, 1257–1265.
- Deitch, E.A. (2005). Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock Augusta Ga* 24 Suppl 1, 19–23.
- Delano, M.J., and Ward, P.A. (2016). Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J. Clin. Invest.* 126, 23–31.
- Delano, M.J., Thayer, T., Gabrilovich, S., Kelly-Scumpia, K.M., Winfield, R.D., Scumpia, P.O., Cuenca, A.G., Warner, E., Wallet, S.M., Wallet, M.A., et al. (2011). Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 195–202.
- Delgoffe, G.M., Woo, S.-R., Turnis, M.E., Gravano, D.M., Guy, C., Overacre, A.E., Bettini, M.L., Vogel, P., Finkelstein, D., Bonnevier, J., et al. (2013). Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* 501, 252–256.
- Dellinger, R.P., Levy, M.M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S.M., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., Douglas, I.S., Jaeschke, R., et al. (2013). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* 41, 580–637.
- Delsing, C.E., Gresnigt, M.S., Leentjens, J., Preijers, F., Frager, F.A., Kox, M., Monneret, G., Venet, F., Bleeker-Rovers, C.P., van de Veerdonk, F.L., et al. (2014). Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect. Dis.* 14, 166.
- Demaret, J., Venet, F., Friggeri, A., Cazalis, M.-A., Plassais, J., Jallades, L., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Textoris, J., Lepape, A., et al. (2015). Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* 98, 1081–1090.
- Dias, S., D’Amico, A., Cretney, E., Liao, Y., Tellier, J., Bruggeman, C., Almeida, F.F., Leahy, J., Belz, G.T., Smyth, G.K., et al. (2017). Effector Regulatory T Cell Differentiation and Immune Homeostasis Depend on the Transcription Factor Myb. *Immunity* 46, 78–91.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193, 1303–1310.

- Dinarello, C.A. (1984). Interleukin-1. *Rev. Infect. Dis.* 6, 51–95.
- Dinarello, C.A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503–508.
- Drewry, A.M., Samra, N., Skrupky, L.P., Fuller, B.M., Compton, S.M., and Hotchkiss, R.S. (2014). Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* Augusta Ga 42, 383–391.
- Dries, D.J. (1996). Interferon gamma in trauma-related infections. *Intensive Care Med.* 22 Suppl 4, S462–467.
- Dries, D.J., Jurkovich, G.J., Maier, R.V., Clemmer, T.P., Struve, S.N., Weigelt, J.A., Stanford, G.G., Herr, D.L., Champion, H.R., and Lewis, F.R. (1994). Effect of interferon gamma on infection-related death in patients with severe injuries. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch. Surg. Chic. Ill* 1960 129, 1031–1041; discussion 1042.
- Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P., and Pugin, J. (2013). Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* 41, 820–832.
- Eichacker, P.Q., Parent, C., Kalil, A., Esposito, C., Cui, X., Banks, S.M., Gerstenberger, E.P., Fitz, Y., Danner, R.L., and Natanson, C. (2002). Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1197–1205.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 1206–1212.
- Fan, M.Y., and Turka, L.A. (2018). Immunometabolism and PI(3)K Signaling As a Link between IL-2, Foxp3 Expression, and Suppressor Function in Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* 9, 69.
- Feng, Y., van der Veeken, J., Shugay, M., Putintseva, E.V., Osmanbeyoglu, H.U., Dikiy, S., Hoyos, B.E., Moltedo, B., Hemmers, S., Treuting, P., et al. (2015). A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature* 528, 132–136.
- Ferrer, R., Artigas, A., Levy, M.M., Blanco, J., González-Díaz, G., Garnacho-Montero, J., Ibáñez, J., Palencia, E., Quintana, M., de la Torre-Prados, M.V., et al. (2008). Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA* 299, 2294–2303.
- Fishman, J.A., and Issa, N.C. (2010). Infection in organ transplantation: risk factors and evolving patterns of infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24, 273–283.
- Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N.K.J., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., Reinhart, K., and International Forum of Acute Care Trialists (2016a). Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 259–272.
- Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D.O., Hartmann, M., Hartog, C.S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U., and Reinhart, K. (2016b). Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch. Arzteblatt Int.* 113, 159–166.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6, 1142–1151.

Forde, P.M., Chaft, J.E., Smith, K.N., Anagnostou, V., Cottrell, T.R., Hellmann, M.D., Zahurak, M., Yang, S.C., Jones, D.R., Broderick, S., et al. (2018). Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 378, 1976–1986.

Forel, J.-M., Chiche, L., Thomas, G., Mancini, J., Farnarier, C., Cognet, C., Guervilly, C., Daumas, A., Vély, F., Xéridat, F., et al. (2012). Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PloS One* 7, e50446.

Fotin-Mlecsek, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A., and Wajant, H. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J. Cell Sci.* 115, 2757–2770.

Francois, B., Jeannet, R., Daix, T., Walton, A.H., Shotwell, M.S., Unsinger, J., Monneret, G., Rimmelé, T., Blood, T., Morre, M., et al. (2018). Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 3.

Friedline, R.H., Brown, D.S., Nguyen, H., Kornfeld, H., Lee, J., Zhang, Y., Appleby, M., Der, S.D., Kang, J., and Chambers, C.A. (2009). CD4⁺ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J. Exp. Med.* 206, 421–434.

Furebring, M., Håkansson, L.D., Venge, P., Nilsson, B., and Sjölin, J. (2002). Expression of the C5a receptor (CD88) on granulocytes and monocytes in patients with severe sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 6, 363–370.

Gaieski, D.F., Edwards, J.M., Kallan, M.J., and Carr, B.G. (2013). Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit. Care Med.* 41, 1167–1174.

Galbois, A., Aegerter, P., Martel-Samb, P., Housset, C., Thabut, D., Offenstadt, G., Ait-Oufella, H., Maury, E., Guidet, B., and Collège des Utilisateurs des Bases des données en Réanimation (CUB-Réa) Group (2014). Improved prognosis of septic shock in patients with cirrhosis: a multicenter study*. *Crit. Care Med.* 42, 1666–1675.

Garín, M.I., Chu, C.-C., Golshayan, D., Cernuda-Morollón, E., Wait, R., and Lechler, R.I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood* 109, 2058–2065.

Gautier, E.L., Huby, T., Saint-Charles, F., Ouzilleau, B., Chapman, M.J., and Lesnik, P. (2008). Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 6941–6946.

Gavin, M.A., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A. (2002). Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 33–41.

Gayat, E., Cariou, A., Deye, N., Vieillard-Baron, A., Jaber, S., Damoiseil, C., Lu, Q., Monnet, X., Rennuit, I., Azoulay, E., et al. (2018). Determinants of long-term outcome in ICU survivors: results from the FROG-ICU study. *Crit. Care Lond. Engl.* 22, 8.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903–914.

Giamarellos-Bourboulis, E.J., Apostolidou, E., Lada, M., Perdios, I., Gatselis, N.K., Tsangaris, I., Georgitsi, M., Bristianou, M., Kanni, T., Sereti, K., et al. (2013). Kinetics of circulating immunoglobulin M in sepsis: relationship with final outcome. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, R247.

Godfrey, V.L., Wilkinson, J.E., Rinchik, E.M., and Russell, L.B. (1991). Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5528–5532.

Gonçalves, M.C., Horewicz, V.V., Lückemeyer, D.D., Prudente, A.S., and Assreuy, J. (2017). Experimental Sepsis Severity Score Associated to Mortality and Bacterial Spreading is Related to Bacterial Load and Inflammatory Profile of Different Tissues. *Inflammation* 40, 1553–1565.

Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 1783–1786.

Gong, D., and Malek, T.R. (2007). Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 242–252.

Gosseze, M., Rimmelé, T., Andrieu, T., Debord, S., Bayle, F., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Monneret, G., and Venet, F. (2018). Proof of concept study of mass cytometry in septic shock patients reveals novel immune alterations. *Sci. Rep.* 8, 17296.

Gouel-Chéron, A., Venet, F., Allaouchiche, B., and Monneret, G. (2012). CD4+ T-lymphocyte alterations in trauma patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 16, 432.

Govindaraj, C., Tan, P., Walker, P., Wei, A., Spencer, A., and Plebanski, M. (2014). Reducing TNF receptor 2+ regulatory T cells via the combined action of azacitidine and the HDAC inhibitor, panobinostat for clinical benefit in acute myeloid leukemia patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 724–735.

Greenberg, J.A., Hrusch, C.L., Jaffery, M.R., David, M.Z., Daum, R.S., Hall, J.B., Kress, J.P., Sperling, A.I., and Verhoef, P.A. (2018). Distinct T-helper cell responses to *Staphylococcus aureus* bacteremia reflect immunologic comorbidities and correlate with mortality. *Crit. Care Lond. Engl.* 22, 107.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793–802.

Grimaldi, D., Louis, S., Pène, F., Sirgo, G., Rousseau, C., Claessens, Y.E., Vimeux, L., Cariou, A., Mira, J.P., Hosmalin, A., et al. (2011). Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 37, 1438–1446.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.

Guérin, E., Orabona, M., Raquil, M.-A., Giraudeau, B., Bellier, R., Gibot, S., Béné, M.-C., Lacombe, F., Droin, N., Solary, E., et al. (2014). Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit. Care Med.* 42, 2007–2018.

Guignant, C., Lepape, A., Huang, X., Kherouf, H., Denis, L., Poitevin, F., Malcus, C., Chéron, A., Allaouchiche, B., Gueyffier, F., et al. (2011). Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 15, R99.

Guisset, O., Dilhuydy, M.-S., Thiébaud, R., Lefèvre, J., Camou, F., Sarrat, A., Gabinski, C., Moreau, J.-F., and Blanco, P. (2007). Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 33, 148–152.

Gupta, D.L., Bhoi, S., Mohan, T., Galwankar, S., and Rao, D.N. (2016). Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with post traumatic sepsis. *Cytokine* 88, 214–221.

Gustave, C.-A., Gossez, M., Demaret, J., Rimmelé, T., Lepape, A., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Jallades, L., Textoris, J., Monneret, G., et al. (2018). Septic Shock Shapes B Cell Response toward an Exhausted-like/Immunoregulatory Profile in Patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 200, 2418–2425.

Hall, M.W., Knatz, N.L., Vetterly, C., Tomarello, S., Wewers, M.D., Volk, H.D., and Carcillo, J.A. (2011). Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 37, 525–532.

Hauer, J., Püschner, S., Ramakrishnan, P., Simon, U., Bongers, M., Federle, C., and Engelmann, H. (2005). TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2874–2879.

He, X., Landman, S., Bauland, S.C.G., van den Dolder, J., Koenen, H.J.P.M., and Joosten, I. (2016). A TNFR2-Agonist Facilitates High Purity Expansion of Human Low Purity Treg Cells. *PLoS One* 11, e0156311.

Hein, F., Massin, F., Cravoisy-Popovic, A., Barraud, D., Levy, B., Bollaert, P.-E., and Gibot, S. (2010). The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit. Care Lond. Engl.* 14, R19.

Hill, J.A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D., and Benoist, C. (2007). Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27, 786–800.

Höfer, T., Krichevsky, O., and Altan-Bonnet, G. (2012). Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Front. Immunol.* 3, 268.

Horiguchi, H., Loftus, T.J., Hawkins, R.B., Raymond, S.L., Stortz, J.A., Hollen, M.K., Weiss, B.P., Miller, E.S., Bihorac, A., Larson, S.D., et al. (2018). Innate Immunity in the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome and Its Implications for Therapy. *Front. Immunol.* 9, 595.

Horwitz, D.A., Zheng, S.G., Wang, J., and Gray, J.D. (2008). Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *Eur. J. Immunol.* 38, 912–915.

Hotchkiss, R.S., and Moldawer, L.L. (2014). Parallels between cancer and infectious disease. *N. Engl. J. Med.* 371, 380–383.

Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E., Schmieg, R.E., Hui, J.J., Chang, K.C., Osborne, D.F., Freeman, B.D., Cobb, J.P., Buchman, T.G., et al. (2001a). Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 6952–6963.

Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E., Schmieg, R.E., Hui, J.J., Chang, K.C., Osborne, D.F., Freeman, B.D., Cobb, J.P., Buchman, T.G., et al. (2001b). Sepsis-induced apoptosis causes progressive

profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 6952–6963.

Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E., Grayson, M.H., Osborne, D.F., Wagner, T.H., Cobb, J.P., Coopersmith, C., and Karl, I.E. (2002). Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 2493–2500.

Hotchkiss, R.S., Osmon, S.B., Chang, K.C., Wagner, T.H., Coopersmith, C.M., and Karl, I.E. (2005). Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 5110–5118.

Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013a). Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 260–268.

Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013b). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 862–874.

Hotchkiss, R.S., Moldawer, L.L., Opal, S.M., Reinhart, K., Turnbull, I.R., and Vincent, J.-L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16045.

Hotchkiss, R.S., Colston, E., Yende, S., Angus, D.C., Moldawer, L.L., Crouser, E.D., Martin, G.S., Coopersmith, C.M., Brakenridge, S., Mayr, F.B., et al. (2019). Immune Checkpoint Inhibition in Sepsis: A Phase 1b Randomized, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose Study of Antiprogrammed Cell Death-Ligand 1 (BMS-936559). *Crit. Care Med.*

Hou, H., Liu, W., Wu, S., Lu, Y., Peng, J., Zhu, Y., Lu, Y., Wang, F., and Sun, Z. (2014). Tim-3 negatively mediates natural killer cell function in LPS-induced endotoxic shock. *PloS One* **9**, e110585.

Hsieh, C.-S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* **21**, 267–277.

Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495–504.

Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* **21**, 503–513.

Huang, X., Venet, F., Wang, Y.L., Lepape, A., Yuan, Z., Chen, Y., Swan, R., Kherouf, H., Monneret, G., Chung, C.-S., et al. (2009). PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6303–6308.

Ibn Saïed, W., Mourvillier, B., Cohen, Y., Ruckly, S., Reignier, J., Marcotte, G., Siami, S., Bouadma, L., Darmon, M., de Montmollin, E., et al. (2019). A Comparison of the Mortality Risk Associated With Ventilator-Acquired Bacterial Pneumonia and Nonventilator ICU-Acquired Bacterial Pneumonia. *Crit. Care Med.* **47**, 345–352.

Inoue, S., Bo, L., Bian, J., Unsinger, J., Chang, K., and Hotchkiss, R.S. (2011). Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis. *Shock Augusta Ga* **36**, 38–44.

Israël, A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000158.

Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.-H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F.X.-F., Gilliet, M., and Liu, Y.-J. (2008). Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28, 870–880.

Iwashyna, T.J., Ely, E.W., Smith, D.M., and Langa, K.M. (2010). Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 304, 1787–1794.

Jacqueline, C., Broquet, A., Roquilly, A., Davieau, M., Caillon, J., Altare, F., Potel, G., and Asehnoune, K. (2014). Linezolid dampens neutrophil-mediated inflammation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia and protects the lung of associated damages. *J. Infect. Dis.* 210, 814–823.

Jain, S., Self, W.H., Wunderink, R.G., Fakhran, S., Balk, R., Bramley, A.M., Reed, C., Grijalva, C.G., Anderson, E.J., Courtney, D.M., et al. (2015). Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N. Engl. J. Med.* 373, 415–427.

Jamme, M., Daviaud, F., Charpentier, J., Marin, N., Thy, M., Hourmant, Y., Mira, J.-P., and Pène, F. (2017). Time Course of Septic Shock in Immunocompromised and Nonimmunocompromised Patients. *Crit. Care Med.* 45, 2031–2039.

Jia, W., Cao, L., Yang, S., Dong, H., Zhang, Y., Wei, H., Jing, W., Hou, L., and Wang, C. (2013). Regulatory T cells are protective in systemic inflammation response syndrome induced by zymosan in mice. *PloS One* 8, e64397.

Jiménez-Sousa, M.Á., Medrano, L.M., Liu, P., Almansa, R., Fernández-Rodríguez, A., Gómez-Sánchez, E., Rico, L., Heredia-Rodríguez, M., Gómez-Pesquera, E., Tamayo, E., et al. (2017). IL-1B rs16944 polymorphism is related to septic shock and death. *Eur. J. Clin. Invest.* 47, 53–62.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193, 1285–1294.

Josefowicz, S.Z., Niec, R.E., Kim, H.Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D.T., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* 482, 395–399.

Kallies, A., and Nutt, S.L. (2007). Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp-1. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 156–162.

Kallies, A., Hawkins, E.D., Belz, G.T., Metcalf, D., Hommel, M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat. Immunol.* 7, 466–474.

Kasten, K.R., Muenzer, J.T., and Caldwell, C.C. (2010a). Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 28–31.

Kasten, K.R., Prakash, P.S., Unsinger, J., Goetzman, H.S., England, L.G., Cave, C.M., Seitz, A.P., Mazuski, C.N., Zhou, T.T., Morre, M., et al. (2010b). Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infect. Immun.* 78, 4714–4722.

Kaukonen, K.-M., Bailey, M., Suzuki, S., Pilcher, D., and Bellomo, R. (2014). Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* 311, 1308–1316.

Khoja, L., Day, D., Wei-Wu Chen, T., Siu, L.L., and Hansen, A.R. (2017). Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 28, 2377–2385.

Kilpatrick, L.E., Sun, S., Mackie, D., Baik, F., Li, H., and Korchak, H.M. (2006). Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1512–1521.

Kim, E.Y., Priatel, J.J., Teh, S.-J., and Teh, H.-S. (2006). TNF receptor type 2 (p75) functions as a costimulator for antigen-driven T cell responses in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 1026–1035.

Kitagawa, Y., and Sakaguchi, S. (2017). Molecular control of regulatory T cell development and function. *Curr. Opin. Immunol.* 49, 64–70.

de Kleijn, S., Langereis, J.D., Leentjens, J., Kox, M., Netea, M.G., Koenderman, L., Ferwerda, G., Pickkers, P., and Hermans, P.W.M. (2013). IFN- γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PloS One* 8, e72249.

Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* 10, 595–602.

Kovach, M.A., and Standiford, T.J. (2012). The function of neutrophils in sepsis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 321–327.

Krishack, P.A., Louviere, T.J., Decker, T.S., Kuzel, T.G., Greenberg, J.A., Camacho, D.F., Hrusch, C.L., Sperling, A.I., and Verhoef, P.A. (2019). Protection against *Staphylococcus aureus* bacteremia-induced mortality depends on ILC2s and eosinophils. *JCI Insight* 4.

Kumar, P., Saini, S., and Prabhakar, B.S. (2019). Cancer immunotherapy with check point inhibitor can cause autoimmune adverse events due to loss of Treg homeostasis. *Semin. Cancer Biol.*

Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., and Sakaguchi, S. (2000). Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol.* 12, 1145–1155.

Landelle, C., Lepape, A., Français, A., Tognet, E., Thizy, H., Voirin, N., Timsit, J.F., Monneret, G., and Vanhems, P. (2008). Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol. Off. J. Soc. Hosp. Epidemiol. Am.* 29, 1054–1065.

Landelle, C., Lepape, A., Voirin, N., Tognet, E., Venet, F., Bohé, J., Vanhems, P., and Monneret, G. (2010). Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* 36, 1859–1866.

Langereis, J.D., Pickkers, P., de Kleijn, S., Gerretsen, J., de Jonge, M.I., and Kox, M. (2017). Spleen-derived IFN- γ induces generation of PD-L1⁺-suppressive neutrophils during endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 102, 1401–1409.

- Lathrop, S.K., Bloom, S.M., Rao, S.M., Nutsch, K., Lio, C.-W., Santacruz, N., Peterson, D.A., Stappenbeck, T.S., and Hsieh, C.-S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478, 250–254.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371–381.
- Le, J.M., and Vilcek, J. (1989). Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 61, 588–602.
- Le Tulzo, Y., Pangault, C., Gacouin, A., Guilloux, V., Tribut, O., Amiot, L., Tattevin, P., Thomas, R., Fauchet, R., and Drénou, B. (2002). Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18, 487–494.
- Leithäuser, F., Meinhardt-Krajina, T., Fink, K., Wotschke, B., Möller, P., and Reimann, J. (2006). Foxp3-expressing CD103+ regulatory T cells accumulate in dendritic cell aggregates of the colonic mucosa in murine transfer colitis. *Am. J. Pathol.* 168, 1898–1909.
- Leligdowicz, A., and Matthay, M.A. (2019). Heterogeneity in sepsis: new biological evidence with clinical applications. *Crit. Care Lond. Engl.* 23, 80.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 233–258.
- Letessier, W., Demaret, J., Gossez, M., Allam, C., Venet, F., Rimmelé, T., and Monneret, G. (2018). Decreased intra-lymphocyte cytokines measurement in septic shock patients: A proof of concept study in whole blood. *Cytokine* 104, 78–84.
- Levine, A.G., Arvey, A., Jin, W., and Rudensky, A.Y. (2014). Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat. Immunol.* 15, 1070–1078.
- Levine, A.G., Mendoza, A., Hemmers, S., Molledo, B., Niec, R.E., Schizas, M., Hoyos, B.E., Putintseva, E.V., Chaudhry, A., Dikiy, S., et al. (2017). Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature* 546, 421–425.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M.G. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* 193, 1295–1302.
- Levy, M.M., Artigas, A., Phillips, G.S., Rhodes, A., Beale, R., Osborn, T., Vincent, J.-L., Townsend, S., Lemeshow, S., and Dellinger, R.P. (2012). Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 12, 919–924.
- Levy, M.M., Rhodes, A., Phillips, G.S., Townsend, S.R., Schorr, C.A., Beale, R., Osborn, T., Lemeshow, S., Chiche, J.-D., Artigas, A., et al. (2015). Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit. Care Med.* 43, 3–12.
- Lewis, A.J., Lee, J.S., and Rosengart, M.R. (2018). Translational Sepsis Research: Spanning the Divide. *Crit. Care Med.* 46, 1497–1505.

- Li, J., Li, M., Su, L., Wang, H., Xiao, K., Deng, J., Jia, Y., Han, G., and Xie, L. (2015). Alterations of T helper lymphocyte subpopulations in sepsis, severe sepsis, and septic shock: a prospective observational study. *Inflammation* 38, 995–1002.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 5916–5926.
- Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J.P., and Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* 1, 417–425.
- Limaye, A.P., Kirby, K.A., Rubenfeld, G.D., Leisenring, W.M., Bulger, E.M., Neff, M.J., Gibran, N.S., Huang, M.-L., Santo Hayes, T.K., Corey, L., et al. (2008). Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 300, 413–422.
- Linder, A., Guh, D., Boyd, J.H., Walley, K.R., Anis, A.H., and Russell, J.A. (2014). Long-term (10-year) mortality of younger previously healthy patients with severe sepsis/septic shock is worse than that of patients with nonseptic critical illness and of the general population. *Crit. Care Med.* 42, 2211–2218.
- Liston, A., and Gray, D.H.D. (2014). Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 154–165.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* 203, 1701–1711.
- Liu, Z., Mahale, P., and Engels, E.A. (2019). Sepsis and Risk of Cancer Among Elderly Adults in the United States. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 68, 717–724.
- Luan, Y., Yin, C., Qin, Q., Dong, N., Zhu, X., Sheng, Z., Zhang, Q., and Yao, Y. (2015). Effect of Regulatory T Cells on Promoting Apoptosis of T Lymphocyte and Its Regulatory Mechanism in Sepsis. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 35, 969–980.
- Lukaszewicz, A.-C., Grienay, M., Resche-Rigon, M., Pirracchio, R., Faivre, V., Boval, B., and Payen, D. (2009). Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit. Care Med.* 37, 2746–2752.
- Luyt, C.-E., Combes, A., Deback, C., Aubriot-Lorton, M.-H., Nieszkowska, A., Trouillet, J.-L., Capron, F., Agut, H., Gibert, C., and Chastre, J. (2007). Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 935–942.
- Mahmud, S.A., Manlove, L.S., and Farrar, M.A. (2013). Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAK-STAT* 2.
- Majno, G. (1991). The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J. Infect. Dis.* 163, 937–945.
- Malek, T.R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., and Kong, L. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17, 167–178.
- Mantel, P.-Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Rückert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B.N., Hendriks, R.W., Cramer, R., et al. (2007). GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol.* 5, e329.

- Martin, E.M., Remke, A., Pfeifer, E., Polz, J., Pietryga-Krieger, A., Steffens-Weber, D., Freudenberg, M.A., Mostböck, S., and Männel, D.N. (2014). TNFR2 maintains adequate IL-12 production by dendritic cells in inflammatory responses by regulating endogenous TNF levels. *Innate Immun.* *20*, 712–720.
- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., and Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1546–1554.
- Martins, G.A., Cimmimo, L., Shapiro-Shelef, M., Szabolcs, M., Herron, A., Magnusdottir, E., and Calame, K. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat. Immunol.* *7*, 457–465.
- Mathias, B., Delmas, A.L., Ozrazgat-Baslanti, T., Vanzant, E.L., Szpila, B.E., Mohr, A.M., Moore, F.A., Brakenridge, S.C., Brumback, B.A., Moldawer, L.L., et al. (2017). Human Myeloid-derived Suppressor Cells are Associated With Chronic Immune Suppression After Severe Sepsis/Septic Shock. *Ann. Surg.* *265*, 827–834.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 991–1045.
- Mauri, C., and Menon, M. (2017). Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* *127*, 772–779.
- Mayr, F.B., Yende, S., Linde-Zwirble, W.T., Peck-Palmer, O.M., Barnato, A.E., Weissfeld, L.A., and Angus, D.C. (2010). Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *303*, 2495–2503.
- Mayr, F.B., Yende, S., and Angus, D.C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* *5*, 4–11.
- Mazzucchelli, R., and Durum, S.K. (2007). Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 144–154.
- McPherson, D., Griffiths, C., Williams, M., Baker, A., Klodawski, E., Jacobson, B., and Donaldson, L. (2013). Sepsis-associated mortality in England: an analysis of multiple cause of death data from 2001 to 2010. *BMJ Open* *3*.
- Meisel, C., Schefold, J.C., Pschowski, R., Baumann, T., Hetzger, K., Gregor, J., Weber-Carstens, S., Hasper, D., Keh, D., Zuckermann, H., et al. (2009). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *180*, 640–648.
- Melani, C., Major, A., Schowinsky, J., Roschewski, M., Pittaluga, S., Jaffe, E.S., Pack, S.D., Abdullaev, Z., Ahlman, M.A., Kwak, J.J., et al. (2017). PD-1 Blockade in Mediastinal Gray-Zone Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *377*, 89–91.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 762–774.
- Meyer, N.J., Reilly, J.P., Anderson, B.J., Palakshappa, J.A., Jones, T.K., Dunn, T.G., Shashaty, M.G.S., Feng, R., Christie, J.D., and Opal, S.M. (2018). Mortality Benefit of Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist for Sepsis Varies by Initial Interleukin-1 Receptor Antagonist Plasma Concentration. *Crit. Care Med.* *46*, 21–28.

- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.
- van Mierlo, G.J.D., Scherer, H.U., Hameetman, M., Morgan, M.E., Flierman, R., Huizinga, T.W.J., and Toes, R.E.M. (2008). Cutting edge: TNFR-shedding by CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 2747–2751.
- Miller, P.G., Bonn, M.B., and McKarns, S.C. (2015). Transmembrane TNF-TNFR2 Impairs Th17 Differentiation by Promoting IL2 Expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 2633–2647.
- Mina, M.J., Metcalf, C.J.E., de Swart, R.L., Osterhaus, A.D.M.E., and Grenfell, B.T. (2015). Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality. *Science* 348, 694–699.
- Minigo, G., Woodberry, T., Piera, K.A., Salwati, E., Tjitra, E., Kenangalem, E., Price, R.N., Engwerda, C.R., Anstey, N.M., and Plebanski, M. (2009). Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog.* 5, e1000402.
- Mira, J.C., Gentile, L.F., Mathias, B.J., Efron, P.A., Brakenridge, S.C., Mohr, A.M., Moore, F.A., and Moldawer, L.L. (2017). Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness, and Persistent Inflammation-Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Crit. Care Med.* 45, 253–262.
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2004). Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 4676–4680.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899–911.
- Mohr, A., Polz, J., Martin, E.M., Griessl, S., Kammler, A., Pötschke, C., Lechner, A., Bröker, B.M., Mostböck, S., and Männel, D.N. (2012). Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. *Eur. J. Immunol.* 42, 341–352.
- Monneret, G., Debard, A.-L., Venet, F., Bohe, J., Hequet, O., Bienvenu, J., and Lepape, A. (2003). Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit. Care Med.* 31, 2068–2071.
- Monneret, G., Lepape, A., Voirin, N., Bohé, J., Venet, F., Debard, A.-L., Thizy, H., Bienvenu, J., Gueyffier, F., and Vanhems, P. (2006). Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 32, 1175–1183.
- Monneret, G., Demaret, J., Gossez, M., Reverdiau, E., Malergue, F., Rimmelé, T., and Venet, F. (2017). Novel Approach in Monocyte Intracellular TNF Measurement: Application to Sepsis-Induced Immune Alterations. *Shock Augusta Ga* 47, 318–322.
- Morganstein, D.L., Lai, Z., Spain, L., Diem, S., Levine, D., Mace, C., Gore, M., and Larkin, J. (2017). Thyroid abnormalities following the use of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 and programmed death receptor protein-1 inhibitors in the treatment of melanoma. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 86, 614–620.

- Mucida, D., Pino-Lagos, K., Kim, G., Nowak, E., Benson, M.J., Kronenberg, M., Noelle, R.J., and Cheroutre, H. (2009). Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. *Immunity* 30, 471–472; author reply 472–473.
- Murray, C.J.L., and Lopez, A.D. (2013). Measuring the global burden of disease. *N. Engl. J. Med.* 369, 448–457.
- Musher, D.M., Abers, M.S., and Corrales-Medina, V.F. (2019). Acute Infection and Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* 380, 171–176.
- Nagar, M., Jacob-Hirsch, J., Vernitsky, H., Berkun, Y., Ben-Horin, S., Amariglio, N., Bank, I., Kloog, Y., Rechavi, G., and Goldstein, I. (2010). TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3570–3581.
- Naidoo, J., Wang, X., Woo, K.M., Iyriboz, T., Halpenny, D., Cunningham, J., Chaff, J.E., Segal, N.H., Callahan, M.K., Lesokhin, A.M., et al. (2017). Pneumonitis in Patients Treated With Anti-Programmed Death-1/Programmed Death Ligand 1 Therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 709–717.
- Nakahashi-Oda, C., Udayanga, K.G.S., Nakamura, Y., Nakazawa, Y., Totsuka, N., Miki, H., Iino, S., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Shibuya, K., et al. (2016). Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces. *Nat. Immunol.* 17, 441–450.
- Nalos, M., Santner-Nanan, B., Parnell, G., Tang, B., McLean, A.S., and Nanan, R. (2012). Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 110–112.
- Nascimento, D.C., Melo, P.H., Piñeros, A.R., Ferreira, R.G., Colón, D.F., Donate, P.B., Castanheira, F.V., Gozzi, A., Czaikoski, P.G., Niedbala, W., et al. (2017). IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nat. Commun.* 8, 14919.
- Nelson, S., Belknap, S.M., Carlson, R.W., Dale, D., DeBoisblanc, B., Farkas, S., Fotheringham, N., Ho, H., Marrie, T., Movahhed, H., et al. (1998). A randomized controlled trial of filgrastim as an adjunct to antibiotics for treatment of hospitalized patients with community-acquired pneumonia. CAP Study Group. *J. Infect. Dis.* 178, 1075–1080.
- Netea, M.G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M.Y., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Golenbock, D., Gresnigt, M.S., Heneka, M.T., Hoffman, H.M., et al. (2017). A guiding map for inflammation. *Nat. Immunol.* 18, 826–831.
- Ng, W.F., Duggan, P.J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A.D., Isaacs, J.D., and Lechler, R.I. (2001). Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98, 2736–2744.
- Nguyen, D.X., and Ehrenstein, M.R. (2016). Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 213, 1241–1253.
- Nguyen, V., Mendelsohn, A., and Larrick, J.W. (2017). Interleukin-7 and Immunosenescence. *J. Immunol. Res.* 2017, 4807853.

- Ni Choileain, N., MacConmara, M., Zang, Y., Murphy, T.J., Mannick, J.A., and Lederer, J.A. (2006). Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 225–236.
- Nishioka, T., Shimizu, J., Iida, R., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (2006). CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+CD25-Foxp3+ T cells in aged mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 6586–6593.
- Nishizuka, Y., and Sakakura, T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* *166*, 753–755.
- Nomellini, V., Kaplan, L.J., Sims, C.A., and Caldwell, C.C. (2018). Chronic Critical Illness and Persistent Inflammation: What can we Learn from the Elderly, Injured, Septic, and Malnourished? *Shock Augusta Ga* *49*, 4–14.
- Nutt, S.L., Fairfax, K.A., and Kallies, A. (2007). BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 923–927.
- Ohnmacht, C., Park, J.-H., Cording, S., Wing, J.B., Atarashi, K., Obata, Y., Gaboriau-Routhiau, V., Marques, R., Dulauroy, S., Fedoseeva, M., et al. (2015). MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through RORγ⁺ T cells. *Science* *349*, 989–993.
- Okada, M., Hibino, S., Someya, K., and Yoshimura, A. (2014). Regulation of regulatory T cells: epigenetics and plasticity. *Adv. Immunol.* *124*, 249–273.
- Okubo, Y., Torrey, H., Butterworth, J., Zheng, H., and Faustman, D.L. (2016). Treg activation defect in type 1 diabetes: correction with TNFR2 agonism. *Clin. Transl. Immunol.* *5*, e56.
- Olivares-Villagómez, D., Wensky, A.K., Wang, Y., and Lafaille, J.J. (2000). Repertoire requirements of CD4+ T cells that prevent spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 5499–5507.
- Oliveira, N.M., Rios, E.C.S., de Lima, T.M., Victorino, V.J., Barbeiro, H., Pinheiro da Silva, F., Szabo, C., and Soriano, F.G. (2017). Sepsis induces telomere shortening: a potential mechanism responsible for delayed pathophysiological events in sepsis survivors? *Mol. Med. Camb. Mass* *22*, 886–891.
- Opal, S.M., and van der Poll, T. (2015). Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* *277*, 277–293.
- Opal, S.M., Garber, G.E., LaRosa, S.P., Maki, D.G., Freebairn, R.C., Kinasewitz, G.T., Dhainaut, J.-F., Yan, S.B., Williams, M.D., Graham, D.E., et al. (2003). Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *37*, 50–58.
- Otto, G.P., Sossdorf, M., Claus, R.A., Rödel, J., Menge, K., Reinhart, K., Bauer, M., and Riedemann, N.C. (2011). The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit. Care Lond. Engl.* *15*, R183.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J., DePinho, R.A., and Li, M.O. (2010). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 618–627.
- Pachot, A., Monneret, G., Voirin, N., Leissner, P., Venet, F., Bohé, J., Payen, D., Bienvenu, J., Mouglin, B., and Lepape, A. (2005). Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *114*, 61–69.

- Palmer, C., Diehn, M., Alizadeh, A.A., and Brown, P.O. (2006). Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC Genomics* 7, 115.
- Panacek, E.A., Marshall, J.C., Albertson, T.E., Johnson, D.H., Johnson, S., MacArthur, R.D., Miller, M., Barchuk, W.T., Fischkoff, S., Kaul, M., et al. (2004). Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit. Care Med.* 32, 2173–2182.
- Pastille, E., Didovic, S., Brauckmann, D., Rani, M., Agrawal, H., Schade, F.U., Zhang, Y., and Flohé, S.B. (2011). Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 977–986.
- Pavon, A., Binquet, C., Kara, F., Martinet, O., Ganster, F., Navellou, J.-C., Castelain, V., Barraud, D., Cousson, J., Louis, G., et al. (2013). Profile of the risk of death after septic shock in the present era: an epidemiologic study. *Crit. Care Med.* 41, 2600–2609.
- Poehlmann, H., Schefold, J.C., Zuckermann-Becker, H., Volk, H.-D., and Meisel, C. (2009). Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit. Care Lond. Engl.* 13, R119.
- van der Poll, T., van de Veerdonk, F.L., Scicluna, B.P., and Netea, M.G. (2017). The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 407–420.
- Postow, M.A., Sidlow, R., and Hellmann, M.D. (2018). Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N. Engl. J. Med.* 378, 158–168.
- Powrie, F., and Mason, D. (1990). OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J. Exp. Med.* 172, 1701–1708.
- Prescott, H.C., Osterholzer, J.J., Langa, K.M., Angus, D.C., and Iwashyna, T.J. (2016). Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ* 353, i2375.
- Punit, S., Dubé, P.E., Liu, C.Y., Girish, N., Washington, M.K., and Polk, D.B. (2015). Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Restricts the Pathogenicity of CD8(+) T Cells in Mice With Colitis. *Gastroenterology* 149, 993-1005.e2.
- Qiu, P., Cui, X., Sun, J., Welsh, J., Natanson, C., and Eichacker, P.Q. (2013). Antitumor necrosis factor therapy is associated with improved survival in clinical sepsis trials: a meta-analysis. *Crit. Care Med.* 41, 2419–2429.
- Quenot, J.-P., Binquet, C., Kara, F., Martinet, O., Ganster, F., Navellou, J.-C., Castelain, V., Barraud, D., Cousson, J., Louis, G., et al. (2013). The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, R65.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600–603.
- Ranieri, V.M., Thompson, B.T., Barie, P.S., Dhainaut, J.-F., Douglas, I.S., Finfer, S., Gårdlund, B., Marshall, J.C., Rhodes, A., Artigas, A., et al. (2012). Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N. Engl. J. Med.* 366, 2055–2064.

- Raphaël, L., Nahéma, I., Benjamin, G., Paul, L.T., Colin, D., Nathalie, A., Thierry, L.T., Magali, M., Oussama, A.H., Philippe, B., et al. (2019). Risk-benefit assessment of systematic thoracoabdominopelvic CT scan in infective endocarditis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*
- Richman, L.K., Chiller, J.M., Brown, W.R., Hanson, D.G., and Vaz, N.M. (1978). Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *121*, 2429–2434.
- Rivers, E., Nguyen, B., Havstad, S., Ressler, J., Muzzin, A., Knoblich, B., Peterson, E., Tomlanovich, M., and Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group (2001). Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* *345*, 1368–1377.
- Robert, C., Schachter, J., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2521–2532.
- Rode, H.N., Christou, N.V., Bubenik, O., Superina, R., Gordon, J., Meakins, J.L., and MacLean, L.D. (1982). Lymphocyte function in anergic patients. *Clin. Exp. Immunol.* *47*, 155–161.
- Rol, M.-L., Venet, F., Rimmelé, T., Moucadel, V., Cortez, P., Quemeneur, L., Gardiner, D., Griffiths, A., Pachot, A., Textoris, J., et al. (2017). The REAnimation Low Immune Status Markers (REALISM) project: a protocol for broad characterisation and follow-up of injury-induced immunosuppression in intensive care unit (ICU) critically ill patients. *BMJ Open* *7*, e015734.
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 275–288.
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* *212*, 28–50.
- Root, R.K., Lodato, R.F., Patrick, W., Cade, J.F., Fotheringham, N., Milwee, S., Vincent, J.-L., Torres, A., Rello, J., Nelson, S., et al. (2003). Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. *Crit. Care Med.* *31*, 367–373.
- Roquilly, A., McWilliam, H.E.G., Jacqueline, C., Tian, Z., Cinotti, R., Rimbart, M., Wakim, L., Caminschi, I., Lahoud, M.H., Belz, G.T., et al. (2017). Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity* *47*, 135–147.e5.
- Rosenblum, M.D., Way, S.S., and Abbas, A.K. (2016). Regulatory T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 90–101.
- Rossol, M., Meusch, U., Pierer, M., Kaltenhäuser, S., Häntzschel, H., Hauschildt, S., and Wagner, U. (2007). Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 4239–4248.
- Roth, G., Moser, B., Krenn, C., Brunner, M., Haisjackl, M., Almer, G., Gerlitz, S., Wolner, E., Boltz-Nitulescu, G., and Ankersmit, H.J. (2003a). Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *308*, 840–846.
- Roth, G., Moser, B., Krenn, C., Brunner, M., Haisjackl, M., Almer, G., Gerlitz, S., Wolner, E., Boltz-Nitulescu, G., and Ankersmit, H.J. (2003b). Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes

from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 840–846.

Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M., and Goeddel, D.V. (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269, 1424–1427.

Ruggeri, T., Jacqueline, C., Ambrosi, X., Broquet, A., Desfrancois, J., Roquilly, A., Altare, F., and Asehnoune, K. (2019). Immunotherapy With Antiprogrammed Cell Death 1 Antibody Improves Outcome in a Mouse Model of Spinal Cord Injury Followed by *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Crit. Care Med.* 47, e28–e35.

Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C., and Horak, I. (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75, 253–261.

Saito, K., Wagatsuma, T., Toyama, H., Ejima, Y., Hoshi, K., Shibusawa, M., Kato, M., and Kurosawa, S. (2008). Sepsis is characterized by the increases in percentages of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells and plasma levels of soluble CD25. *Tohoku J. Exp. Med.* 216, 61–68.

Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 161, 72–87.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 1151–1164.

Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 490–500.

Salomon, B.L., Leclerc, M., Tosello, J., Ronin, E., Piaggio, E., and Cohen, J.L. (2018). Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front. Immunol.* 9, 444.

Schlenner, S.M., Weigmann, B., Ruan, Q., Chen, Y., and von Boehmer, H. (2012). Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *J. Exp. Med.* 209, 1529–1535.

Schwarcz, L., Chen, M.-J., Vittinghoff, E., Hsu, L., and Schwarcz, S. (2013). Declining incidence of AIDS-defining opportunistic illnesses: results from 16 years of population-based AIDS surveillance. *AIDS Lond. Engl.* 27, 597–605.

Scott-Browne, J.P., Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Ishida-Tsubota, K., Fontenot, J.D., Rudensky, A.Y., Bevan, M.J., and Urdahl, K.B. (2007). Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J. Exp. Med.* 204, 2159–2169.

Scumpia, P.O., Delano, M.J., Kelly-Scumpia, K.M., Weinstein, J.S., Wynn, J.L., Winfield, R.D., Xia, C., Chung, C.S., Ayala, A., Atkinson, M.A., et al. (2007). Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. *Blood* 110, 3673–3681.

Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., et al. (2006a). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203, 1693–1700.

Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., et al. (2006b). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1693–1700.

Seder, R.A., Marth, T., Sieve, M.C., Strober, W., Letterio, J.J., Roberts, A.B., and Kelsall, B. (1998). Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 5719–5728.

Serra, P., Amrani, A., Yamanouchi, J., Han, B., Thiessen, S., Utsugi, T., Verdaguer, J., and Santamaria, P. (2003). CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* *19*, 877–889.

Seymour, C.W., Iwashyna, T.J., Cooke, C.R., Hough, C.L., and Martin, G.S. (2010). Marital status and the epidemiology and outcomes of sepsis. *Chest* *137*, 1289–1296.

Shakoory, B., Carcillo, J.A., Chatham, W.W., Amdur, R.L., Zhao, H., Dinarello, C.A., Cron, R.Q., and Opal, S.M. (2016). Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Crit. Care Med.* *44*, 275–281.

Shankar-Hari, M., Phillips, G.S., Levy, M.L., Seymour, C.W., Liu, V.X., Deutschman, C.S., Angus, D.C., Rubenfeld, G.D., Singer, M., and Sepsis Definitions Task Force (2016). Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* *315*, 775–787.

Shankar-Hari, M., Fear, D., Lavender, P., Mare, T., Beale, R., Swanson, C., Singer, M., and Spencer, J. (2017). Activation-Associated Accelerated Apoptosis of Memory B Cells in Critically Ill Patients With Sepsis. *Crit. Care Med.* *45*, 875–882.

Shen, B., Hu, J., Song, H., Wang, Z., Fan, J., Sun, Y., and Wang, Q. (2019). Antibiotics exacerbated colitis by affecting the microbiota, Treg cells and SCFAs in IL10-deficient mice. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *114*, 108849.

Shevach, E.M. (2006a). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* *25*, 195–201.

Shevach, E.M. (2006b). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* *25*, 195–201.

Shindo, Y., McDonough, J.S., Chang, K.C., Ramachandra, M., Sasikumar, P.G., and Hotchkiss, R.S. (2017a). Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *J. Surg. Res.* *208*, 33–39.

Shindo, Y., Fuchs, A.G., Davis, C.G., Eitas, T., Unsinger, J., Burnham, C.-A.D., Green, J.M., Morre, M., Bochicchio, G.V., and Hotchkiss, R.S. (2017b). Interleukin 7 immunotherapy improves host immunity and survival in a two-hit model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Leukoc. Biol.* *101*, 543–554.

Simonetta, F., Chiali, A., Cordier, C., Urrutia, A., Girault, I., Bloquet, S., Tanchot, C., and Bourgeois, C. (2010). Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2528–2538.

- Singer, A., Adoro, S., and Park, J.-H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 788–801.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C.M., et al. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* *315*, 801–810.
- Smigiel, K.S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K.R., Dudda, J.C., Klonowski, K.D., and Campbell, D.J. (2014). CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.* *211*, 121–136.
- Sorrentino, C., Hossain, F., Rodriguez, P.C., Sierra, R.A., Pannuti, A., Osborne, B.A., Minter, L.M., Miele, L., and Morello, S. (2019). Adenosine A2A Receptor Stimulation Inhibits TCR-Induced Notch1 Activation in CD8+T-Cells. *Front. Immunol.* *10*, 162.
- Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Parlato, M., Fitting, C., Cavaillon, J.-M., and Adib-Conquy, M. (2012a). NK cell tolerance to TLR agonists mediated by regulatory T cells after polymicrobial sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 5850–5858.
- Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Parlato, M., Philippart, F., Misset, B., Cavaillon, J.-M., Adib-Conquy, M., and Captain study group (2012b). Toll-like receptors expression and interferon- γ production by NK cells in human sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* *16*, R206.
- Stephan, F., Yang, K., Tankovic, J., Soussy, C.-J., Dhonneur, G., Duvaldestin, P., Brochard, L., Brun-Buisson, C., Harf, A., and Delclaux, C. (2002). Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit. Care Med.* *30*, 315–322.
- Stephens, D.P., Thomas, J.H., Higgins, A., Bailey, M., Anstey, N.M., Currie, B.J., and Cheng, A.C. (2008). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* *36*, 448–454.
- Stortz, J.A., Murphy, T.J., Raymond, S.L., Mira, J.C., Ungaro, R., Dirain, M.L., Nacionales, D.C., Loftus, T.J., Wang, Z., Ozrazgat-Baslanti, T., et al. (2018). Evidence for Persistent Immune Suppression in Patients Who Develop Chronic Critical Illness After Sepsis. *Shock Augusta Ga* *49*, 249–258.
- Strauss, L., Bergmann, C., and Whiteside, T.L. (2009). Human circulating CD4+CD25^{high}Foxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 1469–1480.
- Sundararajan, V., Macisaac, C.M., Presneill, J.J., Cade, J.F., and Visvanathan, K. (2005). Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. *Crit. Care Med.* *33*, 71–80.
- Sweeney, T.E., Azad, T.D., Donato, M., Haynes, W.A., Perumal, T.M., Henao, R., Bermejo-Martin, J.F., Almansa, R., Tamayo, E., Howrylak, J.A., et al. (2018). Unsupervised Analysis of Transcriptomics in Bacterial Sepsis Across Multiple Datasets Reveals Three Robust Clusters. *Crit. Care Med.* *46*, 915–925.
- Taams, L.S., van Amelsfort, J.M.R., Tiemessen, M.M., Jacobs, K.M.G., de Jong, E.C., Akbar, A.N., Bijlsma, J.W.J., and Lafeber, F.P.J.G. (2005). Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum. Immunol.* *66*, 222–230.
- Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *203*, 505–511.

- Tai, H., Xing, H., Xiang, D., Zhu, Z., Mei, H., Sun, W., and Zhang, W. (2018). Monocyte Programmed Death Ligand-1, A Predictor for 28-Day Mortality in Septic Patients. *Am. J. Med. Sci.* 355, 362–367.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192, 303–310.
- Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A., and Kobayashi, T. (2008). STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.* 283, 14955–14962.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tamayo, E., Gómez, E., Bustamante, J., Gómez-Herreras, J.I., Fonteriz, R., Bobillo, F., Bermejo-Martín, J.F., Castrodeza, J., Heredia, M., Fierro, I., et al. (2012). Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *J. Crit. Care* 27, 415.e1-11.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* 249, 158–175.
- Tang, Q., Boden, E.K., Henriksen, K.J., Bour-Jordan, H., Bi, M., and Bluestone, J.A. (2004). Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34, 2996–3005.
- Tatura, R., Zeschnigk, M., Adamzik, M., Probst-Kepper, M., Buer, J., and Kehrman, J. (2012). Quantification of regulatory T cells in septic patients by real-time PCR-based methylation assay and flow cytometry. *PloS One* 7, e49962.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188, 287–296.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3433–3441.
- Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J.C., John, S., and Taams, L.S. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19446–19451.
- Toker, A., Engelbert, D., Garg, G., Polansky, J.K., Floess, S., Miyao, T., Baron, U., Düber, S., Geffers, R., Giehr, P., et al. (2013). Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 3180–3188.
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* 9, 194–202.
- Torres, A., Ewig, S., Lode, H., Carlet, J., and European HAP working group (2009). Defining, treating and preventing hospital acquired pneumonia: European perspective. *Intensive Care Med.* 35, 9–29.

- Torrey, H., Butterworth, J., Mera, T., Okubo, Y., Wang, L., Baum, D., Defusco, A., Plager, S., Warden, S., Huang, D., et al. (2017). Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs. *Sci. Signal.* *10*.
- Torrey, H., Khodadoust, M., Tran, L., Baum, D., Defusco, A., Kim, Y.H., and Faustman, D.L. (2018). Targeted killing of TNFR2-expressing tumor cells and Tregs by TNFR2 antagonistic antibodies in advanced Sézary syndrome. *Leukemia*.
- Tran, D.Q., Ramsey, H., and Shevach, E.M. (2007). Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* *110*, 2983–2990.
- Unsinger, J., Kazama, H., McDonough, J.S., Griffith, T.S., Hotchkiss, R.S., and Ferguson, T.A. (2010). Sepsis-induced apoptosis leads to active suppression of delayed-type hypersensitivity by CD8+ regulatory T cells through a TRAIL-dependent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 6766–6772.
- Unsinger, J., Burnham, C.-A.D., McDonough, J., Morre, M., Prakash, P.S., Caldwell, C.C., Dunne, W.M., and Hotchkiss, R.S. (2012). Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J. Infect. Dis.* *206*, 606–616.
- Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* *18*, 415–428.
- Vaeth, M., Wang, Y.-H., Eckstein, M., Yang, J., Silverman, G.J., Lacruz, R.S., Kannan, K., and Feske, S. (2019). Tissue resident and follicular Treg cell differentiation is regulated by CRAC channels. *Nat. Commun.* *10*, 1183.
- Van Gool, F., Nguyen, M.L.T., Mumbach, M.R., Satpathy, A.T., Rosenthal, W.L., Giacometti, S., Le, D.T., Liu, W., Brusko, T.M., Anderson, M.S., et al. (2019). A Mutation in the Transcription Factor Foxp3 Drives T Helper 2 Effector Function in Regulatory T Cells. *Immunity* *50*, 362–377.e6.
- Venet, F., and Monneret, G. (2018). Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* *14*, 121–137.
- Venet, F., Pachot, A., Debard, A.-L., Bohé, J., Bienvenu, J., Lepape, A., and Monneret, G. (2004). Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit. Care Med.* *32*, 2329–2331.
- Venet, F., Pachot, A., Debard, A.-L., Bohe, J., Bienvenu, J., Lepape, A., Powell, W.S., and Monneret, G. (2006). Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 6540–6547.
- Venet, F., Chung, C.-S., Monneret, G., Huang, X., Horner, B., Garber, M., and Ayala, A. (2008). Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 523–535.
- Venet, F., Chung, C.-S., Kherouf, H., Geeraert, A., Malcus, C., Poitevin, F., Bohé, J., Lepape, A., Ayala, A., and Monneret, G. (2009). Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* *35*, 678–686.

- Venet, F., Davin, F., Guignant, C., Larue, A., Cazalis, M.-A., Darbon, R., Allombert, C., Mougin, B., Malcus, C., Poitevin-Later, F., et al. (2010a). Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock Augusta Ga* 34, 358–363.
- Venet, F., Davin, F., Guignant, C., Larue, A., Cazalis, M.-A., Darbon, R., Allombert, C., Mougin, B., Malcus, C., Poitevin-Later, F., et al. (2010b). Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock Augusta Ga* 34, 358–363.
- Venet, F., Foray, A.-P., Villars-Méchin, A., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Lepape, A., and Monneret, G. (2012). IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 5073–5081.
- Venet, F., Filipe-Santos, O., Lepape, A., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Grives, A., Plantier, N., Pasqual, N., and Monneret, G. (2013a). Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Crit. Care Med.* 41, 111–119.
- Venet, F., Lukaszewicz, A.-C., Payen, D., Hotchkiss, R., and Monneret, G. (2013b). Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 477–483.
- Venkatesh, D., Hernandez, T., Rosetti, F., Batal, I., Cullere, X., Luscinskas, F.W., Zhang, Y., Stavrakis, G., García-Cardena, G., Horwitz, B.H., et al. (2013). Endothelial TNF receptor 2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon- β autocrine signaling to promote monocyte recruitment. *Immunity* 38, 1025–1037.
- Verhagen, J., and Wraith, D.C. (2010). Comment on “Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells.” *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 7129; author reply 7130.
- Vieira, P.L., Christensen, J.R., Minaee, S., O’Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D.C., and O’Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 172, 5986–5993.
- Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M., and Thijs, L.G. (1996). The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 22, 707–710.
- van Vught, L.A., Klein Klouwenberg, P.M.C., Spitoni, C., Scicluna, B.P., Wiewel, M.A., Horn, J., Schultz, M.J., Nürnberg, P., Bonten, M.J.M., Cremer, O.L., et al. (2016). Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA* 315, 1469–1479.
- Walker, L.S.K. (2013). Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J. Autoimmun.* 45, 49–57.
- Walker, L.S.K., Chodos, A., Eggena, M., Dooms, H., and Abbas, A.K. (2003). Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 198, 249–258.
- Ward, P.A. (2010). The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *J. Innate Immun.* 2, 439–445.

Weber, G.F., Chousterman, B.G., He, S., Fenn, A.M., Nairz, M., Anzai, A., Brenner, T., Uhle, F., Iwamoto, Y., Robbins, C.S., et al. (2015). Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* 347, 1260–1265.

Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* 209, 1723–1742, S1.

Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12, 492–499.

Wick, M., Kollig, E., Muhr, G., and Köller, M. (2000). The potential pattern of circulating lymphocytes TH1/TH2 is not altered after multiple injuries. *Arch. Surg. Chic. Ill* 1960 135, 1309–1314.

Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., et al. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27, 18–20.

Williams, T.W., and Granger, G.A. (1968). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* 219, 1076–1077.

Williams, R.C., Koster, F.T., and Kilpatrick, K.A. (1983). Alterations in lymphocyte cell surface markers during various human infections. *Am. J. Med.* 75, 807–816.

Wilson, J.K., Zhao, Y., Singer, M., Spencer, J., and Shankar-Hari, M. (2018). Lymphocyte subset expression and serum concentrations of PD-1/PD-L1 in sepsis - pilot study. *Crit. Care Lond. Engl.* 22, 95.

Wing, J.B., Tanaka, A., and Sakaguchi, S. (2019). Human FOXP3⁺ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* 50, 302–316.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 322, 271–275.

Wohlfert, E.A., Grainger, J.R., Bouladoux, N., Konkelt, J.E., Oldenhove, G., Ribeiro, C.H., Hall, J.A., Yagi, R., Naik, S., Bhairavabhotla, R., et al. (2011). GATA3 controls Foxp3⁺ regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4503–4515.

Wong, H.R., Cvijanovich, N., Lin, R., Allen, G.L., Thomas, N.J., Willson, D.F., Freishtat, R.J., Anas, N., Meyer, K., Checchia, P.A., et al. (2009). Identification of pediatric septic shock subclasses based on genome-wide expression profiling. *BMC Med.* 7, 34.

Wong, H.R., Salisbury, S., Xiao, Q., Cvijanovich, N.Z., Hall, M., Allen, G.L., Thomas, N.J., Freishtat, R.J., Anas, N., Meyer, K., et al. (2012). The pediatric sepsis biomarker risk model. *Crit. Care Lond. Engl.* 16, R174.

Workman, C.J., and Vignali, D.A.A. (2005). Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 688–695.

Xu, J., Sun, Y., Li, Y., Ruthel, G., Weiss, S.R., Raj, A., Beiting, D., and López, C.B. (2017). Replication defective viral genomes exploit a cellular pro-survival mechanism to establish paramyxovirus persistence. *Nat. Commun.* 8, 799.

- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 1713–1722, S1–19.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., et al. (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16, 1643–1656.
- Yan, F., Du, R., Wei, F., Zhao, H., Yu, J., Wang, C., Zhan, Z., Ding, T., Ren, X., Chen, X., et al. (2015). Expression of TNFR2 by regulatory T cells in peripheral blood is correlated with clinical pathology of lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 64, 1475–1485.
- Yende, S., Austin, S., Rhodes, A., Finfer, S., Opal, S., Thompson, T., Bozza, F.A., LaRosa, S.P., Ranieri, V.M., and Angus, D.C. (2016). Long-Term Quality of Life Among Survivors of Severe Sepsis: Analyses of Two International Trials. *Crit. Care Med.* 44, 1461–1467.
- Yu, A., Zhu, L., Altman, N.H., and Malek, T.R. (2009). A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity* 30, 204–217.
- Yu, F., Sharma, S., Edwards, J., Feigenbaum, L., and Zhu, J. (2015). Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance. *Nat. Immunol.* 16, 197–206.
- Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Krausz, T., Chong, A., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2005). Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J. Exp. Med.* 201, 779–791.
- Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188, 2205–2213.
- Zaragoza, B., Chen, X., Oppenheim, J.J., Baeyens, A., Gregoire, S., Chader, D., Gorochoff, G., Miyara, M., and Salomon, B.L. (2016). Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF. *Nat. Med.* 22, 16–17.
- Zeng, H., Yang, K., Cloer, C., Neale, G., Vogel, P., and Chi, H. (2013). mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature* 499, 485–490.
- Zhang, X., and Morrison, D.C. (1993). Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 54, 444–450.
- Zhang, Y., Zhou, Y., Lou, J., Li, J., Bo, L., Zhu, K., Wan, X., Deng, X., and Cai, Z. (2010). PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit. Care Lond. Engl.* 14, R220.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.-T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458, 351–356.
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808–812.

Zhu, W., Bao, R., Fan, X., Tao, T., Zhu, J., Wang, J., Li, J., Bo, L., and Deng, X. (2013). PD-L1 blockade attenuated sepsis-induced liver injury in a mouse cecal ligation and puncture model. *Mediators Inflamm.* 2013, 361501.

Zorio, V., Venet, F., Delwarde, B., Floccard, B., Marcotte, G., Textoris, J., Monneret, G., and Rimmelé, T. (2017). Assessment of sepsis-induced immunosuppression at ICU discharge and 6 months after ICU discharge. *Ann. Intensive Care* 7, 80.

ANNEXE : Article soumis

T_{reg} cells expressing TNF receptor type 2 play a major role in CD4+ T cells impairment during severe sepsis

Benjamin Jean. Gaborit^{1,2}, Antoine. Roquilly^{1,3*}, Cédric. Louvet^{4*}, Abderrahmane. Sadek^{4,5}, Benoit. Tessoulin⁶, Alexis. Broquet¹, Cédric. Jacqueline¹, Mickael. Vourc'h^{1,3}, Tanguy. Chaumette¹, Marie. Chauveau^{1,2}, Antoine. Asquier^{1,2}, Alexandre. Bourdiol^{1,3}, Virginie. Le Mabecque¹, Marion. Davieau¹, Emilie. Ronin⁸, Jocelyne. Caillon¹, David. Boutoille^{1,2}, Fanny. Couplier⁷, Sophie. Lemoine⁷, Jérémie. Poschmann⁴, Benoit. Salomon⁸, Karim. Asehnoune^{1,3}

1. EA3826 Thérapeutiques Anti-Infectieuses, Institut de Recherche en Santé 2 Nantes Biotech, University of Nantes, 44000 Nantes, France

2. Department of Infectious Diseases, University Hospital of Nantes and CIC 1413, INSERM, Nantes, France

3. Surgical Intensive Care Unit, Hotel Dieu, CHU Nantes, 44093 Nantes, France

4. Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, Inserm, Université de Nantes, France

5. Department of Biology, Faculty of Science, Moulay Ismail University, BP 11201, Zitoune, Meknes, Morocco

6. INSERM, U1232, Université de Nantes, Service d'Hématologie, University Hospital of Nantes, France

7. Institut de Biologie de l'ENS (IBENS), Département de biologie, École normale supérieure, CNRS, INSERM, Université PSL, 75005 Paris, France

8. Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris

* These authors equally participated to this work

24 Referent author: Correspondence should be addressed to Karim Asehnoune. EA3826
25 Thérapeutiques anti-infectieuses, Institut de Recherche en Santé 2 Nantes Biotech, Medical
26 University of Nantes, 44000 Nantes, France. Ph : +33 253482230 e-mail :
27 karim.asehnoune@chu-nantes.fr

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

Summary

Sepsis causes inflammation-induced immunosuppression, which is a major cause of secondary pneumonia. Severe depletion of the CD4⁺ T cell compartment is a hallmark of post-septic immunosuppression. We sought to investigate whether and how FoxP3⁺ T_{reg} cells alter the CD4⁺ T cell compartment and render the septic host prone to secondary bacterial pneumonia. First, we observed in mice that sepsis induced a loss of CD4⁺ T cells respecting T_{reg} cells and resulting in an increased proportion of FoxP3⁺ T_{reg} cells among CD4⁺ T cells. T_{reg} cells from septic animals presented an activated phenotype (high CTLA-4 and IL-10 expression). The depletion of T_{reg} cells limited the decrease in CD4⁺ T cells and restored the capacity to induce CD4⁺ T cell proliferation *in vivo*. RNA sequencing analysis of T_{reg} cells suggested an important role of TNFR2^{pos} T_{reg} cells. TNFR2 was mainly expressed on T_{reg} cells and by using knock-out TNFR2 mice and targeting TNFR2 with a blocking monoclonal antibody, we demonstrated the critical role of this receptor in the immunosuppression observed after sepsis. These observations were reproduced in septic patients presenting systemic inflammation. In these patients, our data paralleled those obtained in mice: 1) the significant decrease of CD4⁺ T cells and the conserved number of T_{reg} cells; 2) the expression of CTLA-4 was dramatically increased in circulating TNFR2^{pos} T_{reg}; 3) The expression of FoxP3 was increased in the spleen. T_{reg} cell expressing TNFR2 is a critical player in sepsis-induced immunosuppression, and TNFR2 could be considered as a potential therapeutic target to overcome sepsis-induced immunosuppression and therefore susceptibility to secondary pneumonia.

Introduction

Sepsis occurs when an infection leads to a systemic inflammatory response with organ failure, which can lead to septic shock (organ failure and hypotension) and death ¹. Despite recent progress in treating these patients, sepsis remains the leading cause of death in intensive care units, and in the hospital causing more than 5 million deaths worldwide ². The burden is very high for society with an estimated cost of \$ 17 billion annually in the United States. Surprisingly, and despite hundreds of therapeutic clinical studies performed in humans, no FDA-approved specific therapeutic options are available ¹. From the 1990s to the present, a significant improvement has been observed in early survival rates with an increasing concern vis-à-vis secondary acquired infections associated with late mortality ¹. In this setting, it was recently reported that the genomic response of septic patients was consistent with immune suppression at the onset of secondary infection ³.

The natural history of sepsis begins with a systemic inflammatory response syndrome. The majority of patients who survive this early phase will develop a sustained compensatory anti-inflammatory response that is actually a protracted immunosuppressive state that may last for years ⁴. Immune alterations alter the capacity to eradicate the primary infection and render septic patients prone to new secondary infections. The question to be addressed is why sepsis-induced immunosuppression renders the septic patient prone to secondary infections.

Severe alteration of the lymphocyte compartment is a hallmark signature of sepsis-induced immune suppression ⁵. Postmortem studies of patients who died from sepsis have shown dramatic losses of lymphocytes in spleens, and other organs ⁶. This lymphopenia mainly involves CD4+ and CD8+ T cells, but also B cells or natural killer cells ^{7,8}. Lymphocyte depletion is accompanied by a decreased number of circulating lymphocytes ^{9,10}, and is

probably highly clinically relevant since the CD4+ T cell counts in septic patients are often as low as those in patients with life-threatening AIDS ¹¹. Studies from bone marrow or solid organ transplantations have clearly shown a direct correlation between low CD4+ T cell counts and opportunistic infection and death ^{12,13}. In the same manner, several studies have suggested that septic patients with severe and persistent lymphopenia have a higher mortality rate than patients without or with lower lymphopenia ⁹. One of the prevailing theories explaining that lymphopenia induces poor outcomes in septic patients relies on the occurrence of secondary nosocomial infections caused by this sepsis-induced immune impairment. During the immunosuppressive phase of sepsis, current data indicate that bacterial pneumonia (first cause of secondary nosocomial infections) occurs in 10%-30% of sepsis patients. Interestingly, it has been assumed that the immune function did not recover in those sepsis patients who died during the late phase of sepsis ¹⁴.

FoxP3+ regulatory T cells (T_{reg}) are good candidates to explain the impairment of the CD4+ T cell compartment observed during sepsis owing to their high suppressive function. They suppress lymphocyte activation through many mechanisms, such as CTLA-4¹⁵ or IL-10¹⁶. However, little is known about T_{reg}-mediated immunosuppression during sepsis ^{17,14,18,19}. We have recently described that T_{reg} cells decreased the ability of dendritic cells to prime CD4+ T cells after bacterial infection ²⁰ is cured but how T_{reg} cells are activated early during sepsis and whether these cells are responsible for CD4+ T cell depletion and susceptibility to secondary pneumonia have not yet been thoroughly investigated. Our findings obtained in a double hit mouse model and in patients indicate that T_{reg} cells, which are highly activated and express TNF receptor 2 (TNFR2), play a major role in severe lymphopenia, and alter the host defense against secondary infection during acute sepsis. TNFR2 could be a therapeutic target to overcome sepsis-induced immunosuppression.

Results

Sepsis increases the susceptibility to secondary pneumonia and induces immunosuppression

To mimic, the frequent clinical scenario of severe sepsis followed by secondary pneumonia¹⁴, we induced sepsis in mice with an intravenous injection of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) followed 3 days later by intra-tracheal injection of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) to induce pneumonia (**Fig. 1a**). In mice with sepsis alone, we observed a spontaneous bacterial clearance in the spleen on day 5 (**Fig. S1a**), and a systemic inflammatory response in the spleen, attested by increased TNF and IL-1 β levels and increased T cell and dendritic cell activation (**Fig. 1b and S1b-d**), as reported in septic patients^{1,2}. We also observed an inflammatory response in the lungs (**Fig. S1e-f**) suggesting an organ dysfunction that characterizes severe sepsis². In order to evaluate the development of immunosuppression in this new mouse model of sepsis, we compared the host response to *P. aeruginosa* pneumonia in mice previously infected or not by *S. aureus*. A dramatic weight loss was observed until day 6 during secondary pneumonia that could not be explained by a higher burden of bacteria or by the additive effect of the two hits taken separately (**Fig. 1c and Fig. S1g**). This weight loss could be a surrogate marker of post-sepsis immunosuppression^{21,22}. These results prompted us to find-out if sepsis alters the response to a secondary pneumonia. The levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-12) and the recruitment of neutrophils in the lungs were decreased during secondary pneumonia compared with pneumonia alone (**Fig. 1d-e**). An important feature of sepsis-induced immunosuppression in humans is impaired lymphocyte function, mainly of CD4+ T cells, with an increased expression of inhibitory checkpoint molecules⁶. PD-1 expression was

increased on splenic CD4+ T cells during secondary pneumonia as compared with sepsis or pneumonia alone (**Fig. 1f**). Finally, we assessed whether the CD4+ T cell compartment would be functionally impaired *in vivo* and tested the ability of the immune system to respond to a newly encountered antigen after the sepsis initiation, as assessed by the proliferation of CD4+ T cells *in vivo* in response to the injection of a new antigen. For this purpose, we used OT-II CD45.1^{pos} transgenic mice expressing a T cell receptor which is specific for ovalbumin-derived peptide and assessed OT-II proliferation in the spleen 5 days after ovalbumin immunization. Strikingly, the number of OT-II cells was dramatically decreased in septic mice infected with *S. aureus* compared with uninfected control mice (**Fig. 1 g**). This series of experiments demonstrated that this model of *S. aureus* sepsis mimicked a clinical scenario with severe impairment of the CD4+ T cells, *in vivo*, associated with an altered pulmonary response to secondary pneumonia.

Sepsis induces major T_{reg} cells activation that generates a suppressive environment

We then assessed the role of T_{reg} cells in immunosuppression caused by *S. aureus* sepsis. As observed in humans suffering severe sepsis⁹, the number of splenic CD4+ T cells was drastically decreased at the third day of *S. aureus* sepsis (**Fig. 2 a**). However, the T_{reg} cell number remained unaltered, resulting in an increased percentage of T_{reg} cells among CD4+ T cells (**Fig. 2b**), as previously reported¹⁹ and advocating for a specific response to sepsis of T_{reg} cells among CD4+ T cells.

In order to better characterize the effects of sepsis on T_{reg} cells, we analyzed the transcriptome of splenic T_{reg} cells 3 days after the induction of sepsis. Principal component analysis (PCA) of 16,112 expressed genes in T_{reg} cells revealed that gene expression profiles of uninfected T_{reg} cells and sepsis T_{reg} cells were separated by PC1 (81% Variance explained),

suggesting that most gene expression variance was associated to infection (**Fig. S2a**) rather than to experimental variation (PC2 8%). Thus, we estimated differentially expressed genes (see methods), and we found 492 that were up-regulated, and 96 were downregulated with an absolute log2-fold change above 1.5 ($Q\text{-value} < 0.05$) (**Fig. 2 c**). *Gzmb*, *Mki67* (Ki67), *Havcr2* (TIM-3) were among the most strongly expressed genes in sepsis T_{reg} cells, suggesting that T_{reg} cells from septic mice were highly activated compared with controls. To gain a more comprehensive overview of the underlying molecular pathways implicated in the sepsis, these differentially expressed genes (DEG) were analyzed for gene ontology (GO) enrichment (**Fig. 2d**). This analysis revealed that sepsis was associated with a transcriptional programming driving biological processes, including cell cycle replication and immunological response, such as adaptive immune regulation (**Fig. 2e**).

In addition, gene set enrichment analysis revealed sepsis T_{reg} cells displayed high expression of the TNF α /NF- κ B pathway (**Fig. S2b**) and IL2/STAT5 activation pathway compared with uninfected T_{reg} cells (**Fig. S2c**). The *Irf4* and *Prdm1* (Blimp 1) transcriptional factors which are required in a non-redundant manner to maintain effector T_{reg} cells differentiation and functions^{23,24} were also up-regulated in sepsis T_{reg} cells (**Fig. 2f**). Finally, many activation markers were up-regulated in sepsis T_{reg} cells, such TNF receptor superfamily genes (*Tnfrsf1b* (TNFR2), *Tnfrsf4* (OX-40), *Tnfrsf7* (CD27), *Tnfrsf8* (CD30), *Tnfrsf9* (4-1BB), *Tnfrsf14* (HVEM), *Tnfrsf18* (GITR)), *Mki67* (Ki67), *Tigit*, *Icos*, *Il10*, *Gzmb*, *Ctla4*, or *Lag3* (**Fig. 2f**). Many of the up-regulated genes encode for molecules involved in the suppressive function of T_{reg} suggesting that T_{reg} from septic mice were highly suppressive. We validated the differential expression of two important markers of activation (CD62L, CD25)^{25,26} and of two suppressive mediators²⁷ (CTLA-4 and IL-10) at a proteinic level (**Fig.**

191 **2g).** Overall, these results demonstrated that sepsis triggered the maintenance and the
192 activation of T_{reg} cells with a high suppressive profile.

193 To demonstrate the role of T_{reg} cells in sepsis-induced immunosuppression, we
194 depleted T_{reg} after the initiation of *S. aureus* sepsis by injection of diphtheria toxin in
195 FoxP3^{DTR} mice (**Fig. S2 d**). Importantly, the depletion of T_{reg} cells restored the expansion of
196 ovalbumin-specific OT-II cells (**Fig. 2h**). The depletion of T_{reg} cells also partially limited CD4+ T
197 cell depletion in infected mice (**Fig. 2i**).

198 Altogether, these data demonstrated that Treg cells are central to the development
199 of post-septic immunosuppression, and notably that the activation of Treg cells alters the
200 CD4+ T cells compartment during *S. aureus* sepsis. OT II experiments also showed that
201 activated T_{reg} cells from septic mice decreased the ability of the immune system to react to
202 newly encountered antigens.

203 We therefore investigated the effects of T_{reg} cells depletion on secondary pneumonia.
204 During secondary pneumonia, the depletion of T_{reg} cells increased the lung recruitment of
205 neutrophils (**Fig. S2e**).

207 ***TNFR2^{pos} T_{reg} cells are highly activated and may suppress CD4+ T cells during sepsis***

208 We thus investigated the cause of activation of Treg cells during sepsis. The
209 expression of TNFR2 identifies a subset of T_{reg} cells with the highest suppressive capacity
210 ^{28,29}. Since the transcript of TNFR2 gene as well as those of its downstream NF-κB signaling
211 pathway were upregulated in the RNA-seq analysis (**Fig. 2e-f**), we hypothesized that the
212 activation of Treg cells during sepsis was dependent of TNFR2. To reinforce this hypothesis,
213 we measured the proportion of the TNFR2^{pos} subset among Treg cells in septic mice and

214 found that the percentage and the number of TNFR2^{pos} T_{reg} cells were increased as
215 compared to uninfected mice (**Fig. 3a**).
216 To evaluate whether there is a specific gene activation of the TNFR2^{pos} T_{reg} cell subset, we
217 monitored the transcriptomic differences between splenic TNFR2^{pos} and TNFR2^{neg} T_{reg} cells
218 three days after the onset of sepsis (see methods). We found 194 up-regulated, and 415
219 were downregulated genes in TNFR2^{pos} T_{reg} cells (>1.5 log2-fold change, *Q*-value<0.05) (**Fig.**
220 **3b**). Interestingly, *Gzmb*, *IL10*, *CCR5*, *Havcr2* (TIM-3), Tigit genes were upregulated in
221 TNFR2^{pos} T_{reg} cells. Also, many activation markers, regulatory molecules, chemokine
222 receptor, transcription factors and anti-apoptotic signaling were up-regulated in sepsis
223 TNFR2^{pos} T_{reg} cells (**Fig. 3c**). The results of the GO analysis suggest that among T_{reg} cells,
224 TNFR2^{pos} T_{reg} cells endorse the majority of effector, immunosuppressive functions compared
225 with TNFR2^{neg} T_{reg} cells (**Fig. 3d**). Finally, we validated by flow cytometry the preferential up-
226 regulation of CTLA-4 in TNFR2^{pos} T_{reg} cells (**Fig. 3e**).

227 To investigate how the TNFR2^{pos} T_{reg} cells contribute to the transcriptomic signature
228 of Treg cells observed in sepsis (**Fig. 2**), we used the sepsis DEG to map each condition on a
229 reduced dimensional space using PCA (**Fig. 3f**). During sepsis, total T_{reg} cells were closer to
230 TNFR2^{pos} T_{reg} subset than to TNFR2^{neg} cells, suggesting that the TNFR2^{pos} T_{reg} cells
231 transcriptome is a major contributor of the T_{reg} cells response. To investigate the underlying
232 genes further, we used unsupervised hierarchical clustering of the differentially expressed
233 gene of the Sepsis DEG in all four conditions (**Fig. 3g**) and found that differentially expressed
234 genes can be subdivided in two separate clusters. The cluster 1, corresponding to the genes
235 activated in sepsis T_{reg} cells and the TNFR2^{pos} subset, were associated to cell cycle and
236 replication (**fig. 3h**). The genes in cluster 2, corresponding to those activated in sepsis T_{reg}
237 cells and in the TNFR2^{neg} subset, drive inflammatory response (**Fig. 3i**). These data indicate

that TNFR2^{pos} T_{reg} cells are the major contributors to sepsis induced T_{reg} cell expression changes and T_{reg} proliferation cell *in vivo*. Besides an increase in cell cycle genes, we found that TNFR2^{pos} T_{reg} cells were enriched for genes related to the IL2-STAT5 pathway under septic conditions, suggesting stability of TNFR2^{pos} T_{reg} cells inhibitory function induced by sepsis (**Fig. S3a**).

To evaluate the role of TNFR2 in the activation of T_{reg} cells during sepsis, we infected TNFR2 knock-out mice (TNFR2 KO). Uninfected TNFR2 KO mice spontaneously display a lower number of splenic CD4 +T cells than wild type mice, but a similar percentage of T_{reg} cells (**Fig. S3b**).

In TNFR2 KO mice, sepsis did not decrease the number of splenic CD4+ T cells, did not increase the percentage of Treg cells among CD4+ T cells or the expression of CTLA4 in Treg cells (**Fig. S3b-3j**). Moreover, the expansion of OT-II cells in response to immunization was not significantly decreased in TNFR2 deficient mice during sepsis (**Fig. 3k**). Overall, these results demonstrate the role of TNFR2 in the activation of T_{reg} cells during sepsis.

Therapeutic use of a blocking monoclonal anti TNFR2 antibody

We then questioned if the inhibition of TNFR2 with a blocking monoclonal antibody could prevent the development of post-septic immunosuppression and decrease the susceptibility to secondary pneumonia. To respond to this question, we treated wild type mice from day 1 to day 3 of sepsis by intraperitoneal injection with a blocking monoclonal antibody against TNFR2 (**fig. 4a**). The treatment of septic mice with the blocking anti-TNFR2 antibody partially restored the expansion of OT-II cells in response to sOVA injected three days after the onset of sepsis (**Fig. 4b-c**). In mice treated with the blocking anti-TNFR2 antibody from day 1 to day 3 after sepsis, then secondary pneumonia was induced (**Fig. 4d**)

and the lung neutrophil infiltrate was restored. Overall, these series of experiments show that a treatment with a monoclonal antibody blocking TNFR2 has the potential to treat sepsis-induced immunosuppression and to restore resistance to secondary infection³⁰.

Expression of TNFR2 on T_{reg} cells from patients suffering septic shock or systemic inflammatory response syndrome

We then aimed to verify the extrapolation of our findings in humans. First, we analyzed PBMC from healthy donors infected *in vitro* with *S. aureus* for 2 hours and found that the total CD4⁺ T cell number was drastically decreased and that the number of CD4⁺FoxP3⁺ T cells was not altered. The expression of FoxP3⁺ was significantly enhanced in CD4⁺ T cell under sepsis condition. TNFR2 was essentially expressed on FoxP3⁺ CD4⁺ T cells particularly under septic condition. These results reproduced what we observed *in vivo* in septic mice (**Fig. 5a**). The expression of CTLA-4 and CD25, two important markers of T_{reg} activity, were up-regulated by the presence of the bacteria in the TNFR2^{pos}T_{reg} subset (**Fig. 5b**).

We also examined the PBMC from severe septic ICU patients (IBIS sepsis cohort **DC-2011-1399**). First, we observed that the number of circulating lymphocytes was decreased for more than 7 days in septic patients (**Fig. 5c**). We also found that the proportion of circulating T_{reg} cells (**Fig. 5d**) and the expression of CTLA-4 in T_{reg} cells (**Fig. 5e**) were increased in septic patients compared with matched healthy controls. The expression of CTLA-4 was much higher in TNFR2^{pos} T_{reg} cells than in TNFR2^{neg} T_{reg} cells in healthy controls and in septic patients. Also, CTLA-4 expression was increased in TNFR2^{pos} T_{reg} cells from septic patients from day 1 to day 7 after sepsis compared with TNFR2^{pos} T_{reg} cells from healthy volunteers (**Fig. 5f**).

Since the proliferation of T cells mainly takes place in lymphoid organs, we questioned if the observations obtained in circulating lymphocytes were representative of the response of lymphoid T_{reg} cells to acute inflammation in lymphoid organs. We compared splenic samples from trauma patients becoming organ donors after brain death because this situation is associated with a severe inflammatory response like in sepsis. Matched splenic samples were obtained in patients undergoing splenectomy for direct spleen trauma or during abdominal surgery (IBIS-BD cohort). The number of FoxP3^{pos} cells was increased in the spleen of acutely “inflamed” patients compared with patients without inflammation, (Fig. 5g).

Discussion

Patients who survive sepsis can develop a long-term immune dysfunction rendering them prone to hospital acquired pneumonia (HAP), a major cause of late morbidity and mortality. Our results can be summarized as follows: (i) T_{reg} cells play a crucial role in the impairment of the CD4⁺ T cell compartment observed during sepsis; (ii) Among the population of T_{reg} cells, the TNFR2^{pos} subset appears to play a particular role in sepsis-induced immunosuppression; (iii) A specific blockade of TNFR2 enhances the number and functions of CD4⁺ T cells and the capacity for the lung to recruit neutrophils to fight secondary pneumonia; (iv) our results in healthy donors and in patients parallel those obtained in mice.

We particularly focused on the post-septic immune system in its capacity to face secondary bacterial pneumonia, and we developed an original and easy to perform sepsis model in which a significant decrease in the absolute number of CD4⁺ T cells is observed. In humans, sepsis impairs the CD4⁺ T cell compartment through apoptosis, T cell exhaustion

and anergy^{14,31}. However, the mechanisms that govern these lymphocyte alterations remain incompletely understood³². By using OT-II cells, we could confirm in vivo that CD4+ effector T cells are unable to proliferate under septic conditions.

In an experimental study³³, T_{reg} cells from septic mice showed more suppression of in vitro T cell proliferation and more suppression of TH1-type cytokine production than T_{reg} cells from sham-injured animals. In another experimental sepsis murine model, the in vitro downregulation of FoxP3 expression using siRNA transfection was associated with restoration of the lymphoproliferative response¹⁹.

T_{reg} cells are probably important players in the sepsis-induced immunosuppression phenomenon since the anergic and suppressive functions are the most important functional properties for these cells as recently demonstrated in infections such as malaria³⁴. In septic shock, an increased percentage of T_{reg} cells was observed, and their persistence was associated with poor prognosis³⁵. In our results, 3 major findings suggest an enhanced T_{reg} cells function in the septic host: 1) Enhanced T_{reg} ratio; 2) restoration of number/proliferation of CD4+ T cells and 3) transcriptomic signature of activated T_{reg} cells confirmed at the protein level by the up-regulation of CTLA-4 expression and IL-10 production. The expression of functionally important molecules such as CTLA-4 is restricted to or greatly increased in the subpopulation of T_{reg} cells with an activated phenotype³⁶. CTLA-4 is also important per se since it displays suppressor functions by blocking the co-stimulatory signal (CD28 on T lymphocytes, CD80/86 on APC)²³.

There are current controversies regarding the role of T_{reg} cells during sepsis. Some authors have reported beneficial effects³⁷ whereas others have described detrimental effects¹⁷. The timing of cell analysis and the variable severity of the sepsis models used explain these disparities. Excessive activation of the immune system is an important cause of

mortality during bacterial infections. Containing the initial overwhelmed immune activation could be therefore beneficial, and activation of T_{reg} cells has been shown to decrease mortality in different acute systemic inflammatory conditions such as LPS-induced shock³⁸, zymozan-induced shock³⁹, sepsis⁴⁰, graft-induced host disease⁴¹. While many publications report the role of T_{reg} cells following experimental sepsis with high lethality^{33,42}, we used a less severe model of sepsis because, septic patients currently survive in general at the price of a much higher rate of post-sepsis infections than in the past. Finally, the crucial question to solve regarding T_{reg} cells suppressive capacities is whether in vitro suppression assay, described in sepsis studies, detects alterations in T_{reg} cells functions that are present in vivo.

A common signature of thymic T_{reg} cells and of T_{reg} cells induced in the periphery is the expression of the transcription factor FoxP3²⁶. However, studies have indicated that the expression of FoxP3 alone is not sufficient to maintain stable T_{reg} cell lineage. T_{reg} cell-specific genes are expressed including *IL2ra* (the gene for CD25), *ctla4*, *IKzf4* (EOS), and neuropilin 1 (NRP1)^{43,44}. These data suggest that additional lineage-defining factors like those retrieved in our transcriptomic analysis act with FoxP3 to ensure that T_{reg} cells are stable and functional. CD4+ T cell anergy can be induced when TCR signaling is not accompanied by strong CD28 costimulatory receptor ligation⁴⁵. The binding of coinhibitory receptors such as CTLA-4, expressed by T_{reg} cells enhances the induction or maintenance of anergy in the T4 compartment by inhibiting both APC and lymphocytes^{46,47,48}. T_{reg} cells undergo further differentiation in the periphery and acquire a fully suppressive effector phenotype characterized by the production of the immunosuppressive cytokine IL-10²³ and by the down-regulation of CD62L⁴⁹. In accordance with these data, we retrieved in T_{reg} cells a decreased expression of CD62L and increased intracellular expression of IL-10 in sepsis compared with sham animals. We also found that genes related to the IL2-STAT5 pathway

were up-regulated under septic conditions compared with sham. IL-2 is crucial for T_{reg} cells, and the binding of IL-2RA (CD25) leads to STAT-5 phosphorylation of FoxP3⁵⁰.

The elevation of TNF- α is a hallmark of severe sepsis explaining why anti-TNF therapies targeting TNF or TNFR1 were tested in septic shock in an attempt to blunt the initial overwhelming inflammatory response^{51,52}. These studies failed to show any clinical benefit probably because, blocking TNFR1 on effector CD4+ T cells was difficult considering the high rate of apoptosis and T cell exhaustion. Moreover, the anti-inflammatory effects of these therapies may have aggravated immunosuppression. On the contrary, T_{reg} cells seem to be resistant to apoptosis during sepsis and TNFR2 which is preferentially expressed on T_{reg} cells may be more accessible to binding with TNF. Oppenheim and his team were the first authors to demonstrate the particular immunosuppressive capacities of the TNFR2^{pos} T_{reg} cells population in mice²⁹. Following this seminal observation, several other studies confirmed that the TNFR2 subset of T_{reg} cells displayed the highest immunosuppressive capacities in a cancer setting⁵³. Indeed, decreased expression of TNFR2 at the surface of T_{reg} cells improved outcome in myeloid leukemia⁵⁴. These high immunosuppressive properties of TNFR2 T_{reg} cells were also retrieved in graft versus host disease⁵⁵. Blocking TNFR2 with monoclonal antibodies impairs T_{reg} cell accumulation in tumors⁵⁶ suggesting a potential for treatment. It was also demonstrated in mice that TNF is able to maintain FoxP3 expression through an interaction with TNFR2⁵⁷. One possible explanation is the phosphorylation of STAT5 which is a critical factor for a differentiation of the T lymphocytes into T_{reg} cells⁵⁰ suggesting a link between STAT5 and TNFR2 expression⁵⁷. In accordance with these data, genes related to the IL2-STAT5 pathway were up-regulated under septic conditions on RNA-seq dataset of sepsis+ T_{reg} cells (CD4+ FoxP3^{GFP+}) TNFR2^{pos} versus sepsis+ TNFR2^{neg} T_{reg} cells. We also found that CTLA-4 expression was significantly up-regulated on TNFR2^{pos} after sepsis

but not on TNFR2^{neg} T_{reg} cells indicating that the TNFR2⁺ subset of T_{reg} cells could play a preeminent role in the immune suppression induced by sepsis. Pro survival genes were significantly upregulated during sepsis in TNFR2^{pos} T_{reg} cells versus TNFR2^{neg}, which is congruent with our RNA seq analysis since Bcl-2 is a critical target in IL-2 signaling⁵⁸, protecting cells from apoptosis. The TNFR2 subset of T_{reg} cells is considered to be highly suppressive in chronic human pathologies like cancer and inflammatory diseases^{28,29}. However, no strong evidences is available to date in acute diseases in humans. Our data obtained in a mouse model and in humans suggest that these cells could also participate in immunodepression in acute inflammatory diseases such as sepsis.

Conclusion

Our results suggest that inhibition of T_{reg} cells restores the number and functions of effector CD4⁺ T cells during sepsis and may protect the host from secondary infection. Interestingly, we provide evidence that TNFR2^{pos} T_{reg} cells are particularly suppressive during sepsis. The restricted expression of TNFR2 on T_{reg} cells is ideal for therapeutical interventions because targeting this receptor will not induce toxicity like that observed with many antibody-based therapies. We therefore propose an original and tailored therapy for sepsis patients by blocking T_{reg} cells with anti-TNFR2 antibodies providing that stratification is necessary to treat solely septic patients with immunosuppression.

Materials and methods:

Mice and bacterial strain RjOrl:SWISS and C57BL/6NRj were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle, France). C57BL/6-Tg (FoxP3-DTR/EGFP)23.2Spar/Mmjax (later named DEREg) were purchased from Charles River laboratories (Saint Germain Nuelles, France). OT-II.Ly5.1.FoxP3EGFP mice (provided by Cedric Louvet) were obtained by crossing OVA-specific TCR-transgenic OT-II mice (B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J)⁵⁹ with Ly5.1 mice (B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyCrl) (from Charles River, France) and FoxP3EGFP reporter mice (from Bernard Malissen⁶⁰). Mice carrying each allele homozygously (hemizyously for FoxP3EGFP in males) were generated following successive intercrossings. C57BL/6 Tnfrsf1b^{tm1Mwm} (later named TNFR2KO) by Dr Salomon. Mice were housed with a day / night cycle and free access to water and food and maintained in specific pathogen-free conditions at the IRS2 Institute Animal Care Facility (Nantes, France) following institutional guidelines and were used for experiments between six and fourteen weeks of age. Experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Nantes (protocol #2126-2130). *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains were grown in Brain Heart Infusion broth overnight at 37°C under agitation. Immediately before use, the bacterial pellet was washed twice with PBS and the inoculum was calibrated by nephelometry at 109 colony-forming units (CFU)/mL.

Human Subjects and Human Samples

Bioresources: IBIS-sepsis (severe septic patients), Nantes, France. Patients were enrolled from January 2014 to December 2018 in the Surgical Intensive Care Units of Nantes University Hospital (France). Human sample collection was approved by an institutional review board and declared to the French Ministry of Health (DC-2011-1399). Written

430 informed consent from a next-of-kin was required for enrollment. Retrospective consent
431 was obtained from patients, when possible. Inclusion criteria were proven bacterial
432 infection, together with a systemic inflammatory response (two signs or more among
433 increased heart rate, abnormal body temperature, increased respiratory rate and abnormal
434 white-cell count) and acute organ dysfunction and/or shock. Exclusion criteria were
435 immunosuppressive drugs and pregnancy. All patients were clinically followed up for 28
436 days. Control samples were collected from matched healthy blood donors (age $\pm$ 10 years,
437 sex, race), recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang,
438 Nantes, France).

439 EDTA-anticoagulated blood samples were withdrawn on day 1, 4 and 7 after primary
440 infection in septic patients (IBIS sepsis). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were
441 isolated by centrifugation, frozen in liquid nitrogen in a 10% DMSO solution and stored until
442 analysis.

443 444 **Method Details**

445 **Induction of sepsis by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and secondary pneumonia by** 446 ***Pseudomonas aeruginosa* (PAO1)**

447 After general anesthesia by continuous inhalation of isoflurane (3% fresh gas flow 0.8L /
448 min), the mouse was placed in prone position and 200 μ L of *S. aureus* suspension was
449 intravenously injected through the suborbital venous plexus. When mentioned, pneumonia
450 was induced as previously described⁶¹. Briefly, mice were anesthetized with isoflurane (3%
451 fresh gas flow 0.8L / min) and placed in dorsal recumbency. Intratracheal insertion of a 24-
452 gauge feeding needle was used to inject 75 μ L of *Pseudomonas aeruginosa* suspension
453 adjusted to 10⁸ CFU/mL (7.5 x 10⁶ CFU/mouse).

Induction of OTII cell proliferation after adoptive transfer

OT-II T cells were purified from pooled lymph nodes (inguinal, axillary, sacral, cervical and mesenteric) and spleen of OT-II mice after lysis of the red blood cells and CD4 +T enrichment (Miltenyi Biotech, Germany). T cell preparations were routinely 85%–95% pure, as determined by flow cytometry.

For assessment of the capacity of antigen presentation in the spleen, mice were injected i.v. with soluble OVA (0.1 mg, A5503, Sigma-Aldrich, France) and OT-II cells ($0.5 - 1.5 \times 10^6$ cells). 5 days later, cells from the spleen were stained with anti-CD4, CD45.1, anti-TCRV α 2, and resuspended in buffer containing $1-3 \times 10^4$ blank calibration particles (Becton Dickinson). The total number of live dividing OT-II was calculated from the number of dividing cells relative to the number of beads present in each sample. Control mice receiving OT-II cells with PBS alone (without OVA).

T_{reg} Cell Depletion

To achieve T_{reg} cells depletion, diphtheria toxin (0.5 μ g i.p for the first injection, then 0.2 μ g i.p for the following injection – Sigma-Aldrich, France) was administrated to *FoxP3*^{GFP}-DTR (DEREG) mice. The first DT injection was performed after induction of sepsis then the following injection was administrated, + 12 H, day+1, +2, +3, before the secondary pneumonia or OTII cell adoptive transfer. After OTII transfer, DT injection was performed day +5 and 7 after *S. aureus* sepsis. Efficiency of depletion (number of cells) was controlled during experiments (in uninfected and sepsis) and routinely exceeded 90%.

Anti-TNFR2 monoclonal antibody treatments

Anti-TNFR2 antibodies (TR75-54.7, isotype Rat IgG2b, κ , 500 μ g/mice, Bioxcell) were intravenously administered 15 min before infection, then 15 min before injection of the OT-II T lymphocytes and OVALBUMIN or secondary pneumonia, 3 days after *S. aureus* sepsis.

478 **Murine T_{reg} cells Isolation, Analysis**

479 Spleens were removed and mechanically dissociated through 100 µm strainer. After red
480 blood cell lysis, cells were fixed and permeabilized (BD cytofix/cytoperm, BD Bioscience). The
481 following conjugated monoclonal antibodies were used: anti-CD3 (145-2C11, BD Bioscience),
482 anti-CD4 (RM4-5, BD Pharmingen), anti-CD25 (PC61, BD Horizon), anti-CD62L (MEL-14; BD
483 Horizon), anti-TNFR2 (TR75-89, BD Pharmingen), anti-CD45.1 (A20.1; eBioscience), anti-TCR
484 VαD (B20.1; BD Bioscience), anti-FoxP3 (MF14, Biolegend), anti-CTLA-4 (UV10-4B9,
485 Biolegend), anti-IL10 (JES5-16E3; BD Horizon), Fixable Viability Dye (eBioscience). IL-10
486 staining was performed using the Fixation/permeabilization solution for cytokines
487 (Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug; Biosciences) and FoxP3, CTLA-4
488 straining using the FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Kit (eBioscience) transcription
489 factors, according to manufacturer instructions. Samples were acquired on LSR-II (Becton
490 Dickinson) and analyzed using Flowjo Software (TreeStar Inc, Ashland, OR).

491 **Human PBMC sepsis induction and T_{reg} cells analysis**

492 Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples were collected from healthy blood
493 donors recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes,
494 France). PBMCs were isolated by density gradient, frozen in liquid nitrogen in a 10% DMSO
495 solution and stored until analysis. After 2 hrs of in vitro co-culture of PBMC (1×10^6 cells)
496 with bacterial suspension (*S. aureus*), PBMC were treated with gentamicin for 20 min. After
497 suspension in a buffer solution (PBS EDTA 0.1% BSA 0.5%) and centrifugation (1500 rpm, 10
498 min at room temperature) the cell pellet was suspended in PBS and FACS analyzed 24 hr
499 later. T_{reg} cells were identified with anti-CD4 (REA623, Miltenyi), anti-CD25 (REA 945,
500 Miltenyi) and anti-CD127 (REA614, Miltenyi), anti-CD120b (REA520, Miltenyi), anti-CTLA-4

501 (REA1003, Miltenyi), anti-FoxP3 (3G3, Miltenyi). T_{reg} cells were identified as
502 CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}/-FoxP3⁺.

503 **Bacteriological assessment of lung and evaluation of systemic dissemination**

504 Lungs and spleen were removed and homogenized in 1 mL of saline buffer (Mixer Mill MM
505 400, Retsch Inc., Newtown, PA, USA) and used for quantitative cultures on Mueller-Hilton
506 agar for 24 hours at 37 °C. Serial dilutions were performed and viable counts after 24 hours
507 of incubation were expressed as the median ± SD log₁₀ Colony Forming Unit (CFU) per gram
508 of organ.

509 **Determination of cytokine levels in the lungs and spleen by ELISA**

510 Immediately after removal, weighed lungs and spleens were mechanically homogenized in
511 cold lysis buffer (1X phosphate buffered saline [PBS, pH 7.4], 0.1% Triton X-100) containing
512 1 mM protease inhibitor cocktail (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Interleukin (IL)-1β,
513 interleukin (IL)-12 and tumor necrosis factor (TNF)-α concentrations in lung and spleen
514 homogenates were quantified with ELISA kits according to manufacturer instructions
515 (eBioscience, France). The protein concentration in each sample was determined using a
516 BCA™ protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

517 **Histology and immunohistochemistry**

518 At 24 hours of infection, groups of mice were euthanized and both lungs were removed and
519 immediately placed in 10% formalin. Formalin-fixed tissues were processed and stained with
520 hematoxylin and eosin (H&E). For neutrophil staining, anti-Ly6-G (clone 1A8, 5 µg/mL,
521 Ozyme, Saint Quentin-en-Yvelines, France) and corresponding isotype control antibodies
522 were used following manufacturer instructions. Slides were scanned with Nanozoomer 2.0–
523 HT C9600 (Hamamatsu, Massy, France) and captured with the constructor's NDP viewer
524 software. lung recruitment of neutrophils was evaluated on histology slides using the Single

Integrative Object eXtraction (SIOX) plugin available in the open-source image analysis software Fiji (www.fiji.sc). For oedema, pixel ratios between alveolar spaces and tissue areas were determined. For neutrophil accumulation, ratio Ly6-G positive pixels and oedema pixels were determined. Data were expressed as percent of lung tissue.

RNA-seq

For cell analysis of RNA, T_{reg} (CD4+FoxP3^{GFP+}) cells sorted with FACS Aria III (purity > 95%) and obtained from pooled spleen (2 mice per sample for T_{reg} cells from uninfected and sepsis mice, or 3 mice for TNFR2^{pos} and TNFR2^{neg} T_{reg} cells from sepsis mice). T_{reg} cells were lysed for RNA preparation using the QIAGEN RNEasy plus mini-kit. Three independent RNA samples were obtained from sepsis T_{reg} cells, uninfected TNFR2^{pos} T_{reg} and TNFR2^{neg} T_{reg} cells. We note that one of the TNFR samples was removed as it showed as an outlier (z-score of total expressed genes > -1.5).

cDNA libraries, RNA sequencing Library preparation and Illumina sequencing were performed at the Ecole normale superieure genomic core facility (Paris, France). 10 ng of total RNA were amplified and converted to cDNA using SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit (Clontech). Afterwards an average of 150 pg of amplified cDNA was used to prepare library following Nextera XT DNA kit (Illumina). Libraries were multiplexed by 12 on 4 high-output flow cells. A 75 bp read sequencing was performed on a NextSeq 500 device (Illumina). A mean of 91,656,036 ± 218,376 passing Illumina quality filter reads was obtained for each of the 12 samples.

The analyses were performed using the Eoulsan pipeline⁶², including read filtering, mapping, alignment filtering, read quantification, normalisation and differential analysis: Before mapping, poly N read tails were trimmed, reads ≤40 bases were removed, and reads with quality mean ≤30 were discarded. Reads were then aligned against the *Mus musculus*

genome from Ensembl version 91 using STAR (version 2.5.2b) ⁶³. Alignments from reads matching more than once on the reference genome were removed using Java version of samtools ⁶⁴. To compute gene expression, Mus musculus GTF genome annotation version 91 from Ensembl database was used. All overlapping regions between alignments and referenced exons were counted using HTSeq-count 0.5.3 ⁶⁵. The sample counts were normalized using DESeq2 1.8.1 ⁶⁶. Statistical treatments and differential analyses were also performed using DESeq2 1.8.1.

For gene set enrichment analysis (GSEA) ^{67,68}, a ranked list of the differentially expressed genes was used with the GSEA Desktop Application v2.2.1, and the Molecular Signatures Database v45.1. We always used sample label (phenotype) permutation and thus applied an FDR cut-off (<0.25) (<http://software.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/Gsea>).

Differential expression analyses were performed using the DESeq2 package ⁶⁶. Low abundance genes were filtered out leaving 16112 genes in the sepsis analysis and 15337 genes for the TNFR DEG analysis. Differentially expressed genes were additionally filtered by an absolute log2 Fold-change of 1.5 while controlling the false discovery rate with the Benjamini-Hochberg method (5%). Gene ontology analysis was carried out using Toppgene suite ⁶⁹.

Statistical Analysis

Data were plotted using GraphPad prism (San Diego, United States). Mann-Whitney unpaired test was used for comparisons between 2 groups. A Kruskal-Wallis test was used for multiple comparisons. When the difference was significant, a Fisher test was used for inter-group comparison. *P*-value < 0.05 for statistical significance.

Adjusted-p-values according to BH method are noted as Q-values through the paper in the RNA-seq analysis.

Author contributions

BG performed experiments, contributed to the study design, data analyses, interpretation of results, writing and revision of the manuscript. AB, MC, TC, MC, AA, MD performed experiments, contributed to interpretation of results, and revision of the manuscript. CL, AS, BT, CJ, VL, ER, JC, DB, FC, SL, JP, BS contributed to interpretation of results, and revision of the manuscript. BG, AR, BS, KA contributed to the study design, data analyses, interpretation of results, and revision of the manuscript. All authors have approved the final manuscript for publication.

Acknowledgments:

We thank the biological resource centre for biobanking (CHU Nantes, Hôtel Dieu, Centre de ressources biologiques (CRB), Nantes, F-44093, France (BRIF : BB-0033-00040)), the Cytometry Facility "Cytocell", University of Nantes and *The École normale supérieure genomic core facility was supported by the France Génomique national infrastructure, funded as part of the "Investissements d'Avenir" program managed by the Agence Nationale de la Recherche (contract ANR-10-INBS-09)*. AR received funding by the *Région Pays de la Loire, France*. This work was supported by Agence Nationale de la recherche (grant ANR-15-CE15-0015-01)

Competing interests: Authors have no conflict of interest to declare.

Data and materials availability: Data can be accessed upon request from the server of the University of Nantes (France).

Legends

Figure 1. Primary *S. aureus* sepsis induces a susceptibility to secondary pneumonia

(a) Experimental outline of intravenous (*i.v*) injection of *S. aureus* (sepsis) followed 3 days later by intra tracheal (*i.t*) injection of *P. aeruginosa* (pneumonia). We compared several groups: sham animals (sepsis-); *S. Aureus* sepsis alone (sepsis+); *P. aeruginosa* pneumonia alone (pneumonia); pneumonia with *prior S. Aureus* sepsis (secondary pneumonia). Samples were withdrawn 72 hours after sepsis or 24 hours after pneumonia unless otherwise stated.

(b) TNF- α concentrations in spleen homogenates in sepsis- group and 2, 6, 24 or 72 hours after *S. aureus* infection (sepsis+). Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 4 mice per group).

(c) Percentage of weight loss within 5 days in sepsis+, sepsis-, pneumonia or secondary pneumonia groups, 100% represent the weight of uninfected mice (sepsis-). Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 4-5 mice per group).

(d) TNF- α , IL-1 β and IL-12 concentrations in lung homogenates. The cytokines were measured 72 hours after sepsis. In the groups of mice with pneumonia, TNF- α was measured 6 hours after the onset of pneumonia; IL-1 β and IL-12, 24 hours after pneumonia. Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 5 mice per group).

(e) Lung sections were analyzed in septic mice with or without pneumonia to quantify neutrophil infiltration by anti-Ly6-G immunohistochemistry. Quantification of Ly6-G positive surface among lung tissue area by SIOX analysis of the slides. Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 5 mice per group).

(f) PD-1 expression among CD4+ T cells (CD3+CD4+FoxP3-) 24 hours after *P. aeruginosa* pneumonia induced 3 days after sepsis or not. Representative dot plots (left panels) and

median $\pm$ SD (right panels) of one representative of two independent experiments (n = 4-5 mice per group).

(g) Naive CD45.2^{pos} mice (sepsis-OVA+) or 3 days after *S. aureus* sepsis (sepsis+OVA+) were i.v. injected with ovalbumin (OVA) and CD45.1^{pos} TCRV α 2^{pos}OT-II cells. For control, naive mice were injected with CD45.1 OT-II cells (i.v) without ovalbumin (sepsis-OVA-). OT-II cell proliferation was assessed in the spleen 5 days after injection of OVA. Representative dot plots (upper panels) and median $\pm$ SD (lower panels) from a representative of three independent experiments (n = 5 mice per group).

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

Figure 2. T_{reg} cell play a major role in functional alterations of conventional CD4⁺ T cells

(a) Splenic CD4⁺ T cell proportions and numbers in uninfected mice (sepsis-) or 3 days after *S. aureus* infection (sepsis+). Representative dot plots (left panels) and median $\pm$ SD from three independent experiments (n = 5 mice per group).

(b) Splenic T_{reg} cells proportions and numbers in uninfected mice (sepsis-) or 3 days after *S. aureus* infection (sepsis+). Representative dot plots (left panels) and median $\pm$ SD from three independent experiments (n = 4-5 mice per group).

(c) Volcano plot of differential gene expression between T_{reg} cells from mice after 3 days of sepsis (sepsis+) and uninfected mice (sepsis-). Significantly differentially expressed genes (Q-value<0.05), Up- and down-regulated genes (log₂FC >1.5 and -1.5) in sepsis T_{reg} cells are highlighted in red and blue, respectively (n = 3 samples per group).

(d) Canonical pathway analysis based on up-regulated genes expressed genes (Q-value<0.05 and >1.5 log₂ fold change) in sepsis T_{reg} cells versus uninfected T_{reg} cells.

(e) Gene Ontology analysis (Toppgene) of up and down-regulated genes (corrected Q-value <0.05, >1.5 fold) in T_{reg} cells from mice after 3 days of sepsis (sepsis+) and uninfected mice (sepsis-). Up- and down-regulated genes in sepsis T_{reg} cells are highlighted in red and blue. Bar chart displays $-\log_{10}$ P-value.

(f) Heatmap of differentially expressed genes (Q-value<0.05) encoding selected activation markers, regulatory molecules, chemokine receptors and transcription factors in Sepsis+ and Sepsis- T_{reg} cells.

(g) Intracellular expression of CTLA-4, IL-10 and membrane expression of CD62L, CD25 in T_{reg} cells from mice infected with *S. aureus* (sepsis+) or not (sepsis-). Representative histograms and median fluorescence intensity (MFI) $\pm$ SD from three independent experiments (n=4-5 mice per group).

(h) CD45.2^{pos} mice uninfected (sepsis-) or 3 days after *S. aureus* sepsis (sepsis+) with or without DT-treated FoxP3-DTR were i.v injected with OVA and CD45.1^{pos} TCR α ^{pos} OT-II cells. OT-II proliferation was assessed 5 days later in the spleen. Sepsis T_{reg} cells depletion (i.p): DT 0.5 μ g for the first injection, then 0.2 μ g for the following injections, administered + 12 hours, day+1, +2, +3, +5 and day+7 after *S. aureus* sepsis. Representative dot plots (upper panels) and median $\pm$ SD (lower panels) from a representative of three independent experiments (n = 4-5 mice per group).

(i) Frequency and number of CD4+ T cells at 7 days of sepsis (Sepsis+), 7 days after sepsis with T_{reg} cells depletion (sepsis+ T_{reg} depletion) and in uninfected mice (sepsis-). Representative dot plots (left panels) and median $\pm$ SD (right panels) from a representative of two independent experiments (n = 5 mice per group).

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

Figure 3. Transcriptome and phenotype analysis of TNFR2^{neg} and TNFR2^{pos} T_{reg} cells during sepsis

(a) Splenic TNFR2^{pos}T_{reg} cell proportions and numbers in uninfected mice (sepsis-) or 3 days after *S. aureus* infection (sepsis+). Representative dot plots mean fluorescence intensity (MFI) and median $\pm$ SD from 3 independent experiments (n = 4-5 mice per group).

(b) Volcano plot of differential gene expression between TNFR2^{pos}T_{reg} cells and TNFR2^{neg}T_{reg} cells from mice after 3 days of sepsis. Significantly differentially expressed genes (Q-value<0.05), Up- and down-regulated genes (log2FC >1.5 and -1.5) in sepsis T_{reg} cells are highlighted respectively in red or blue, respectively.

(c) Heatmap of differentially expressed genes (Q-value<0.05) encoding selected activation markers, regulatory molecules, chemokine receptors, transcription factors and anti-apoptotic molecules in TNFR2^{pos}T_{reg} and TNFR2^{neg}T_{reg} cells.

(d) Gene Ontology analysis (Toppgene) of differentially regulated genes (corrected Q-value <0.05, >1.5 fold) in TNFR2^{pos}T_{reg} cells in mice after 3 days of sepsis. Up- and down-regulated functions in TNFR2^{pos}T_{reg} cells are highlighted in red and blue. Bar chart displays $-\log_{10}$ P-value.

(e) Intracellular expression of CTLA-4 in TNFR2^{pos}T_{reg} and TNFR2^{neg}T_{reg} cell from mice not infected (sepsis-) or after 3 days of sepsis (sepsis+). Representative histograms and mean fluorescence intensity (MFI) $\pm$ SD representative from three independent experiments (n=5 mice per group).

(f) Principal component analysis of T_{reg} sepsis-, T_{reg} sepsis+, TNFR2^{pos}T_{reg} and TNFR2^{neg}T_{reg} cells. PC1 and PC2 show the percentage of variance explained for 15,337 expressed genes.

(g) Heatmap of unsupervised hierarchical clustering of the differentially expressed gene (corrected Q-value <0.05, >1.5 fold) between sepsis+ T_{reg}, sepsis- T_{reg} cells. Clustering

grouped the splenic T_{reg} cells into 2 gene clusters. gene ontology analysis of genes found in cluster 1 (h) and cluster 2 (i).

(h) Gene Ontology analysis (Toppgene) of genes in cluster 1. Bar chart displays $-\log_{10} P$ -value.

(i) Gene Ontology analysis (Toppgene) of genes in cluster 2. Bar chart displays $-\log_{10} P$ -value.

(j) Intracellular expression of CTLA-4 in T_{reg} cells from mice not infected or after 3 days of sepsis from WT mice or TNFR2 KO mice. Representative histograms and mean fluorescence intensity (MFI) $\pm$ SD from 2 independent experiments (n=4-5 mice per group).

(k) In CD45.2^{pos} mice, uninfected (sepsis-) or 3 days after *S. aureus* sepsis (sepsis+) WT or TNFR2KO animals were injected with OVA (i.v) and CD45.1^{pos} OT-II cell (i.v). OT-II proliferation was assessed 5 days later in the spleen. Representative dot plots (upper panels) and median $\pm$ SD (lower panels) from a representative of three independent experiments (n = 4 mice per group).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4. TNFR2 functions during sepsis and pneumonia

(a) Schematic diagram of the experimental outline of monoclonal anti-TNFR2 blocking antibody treatment and transfer of OT-II cell during *S. aureus* sepsis.

(b and c) Septic mice were treated with blocking mAb anti-TNFR2 (Sepsis+ anti-TNFR2) or with isotype control at day 1 and day 3, then mice were i.v. injected with OVA and OT-II cells. The proliferation of OT-II cells was assessed 5 days later in the spleen. (c) Representative dot plots and (c) medians $\pm$ SD of 2 independent experiments (n = 4-5 mice per group).

(d) Schematic diagram of the experimental outline of *P. aeruginosa* pneumonia alone (pneumonia group), of *P. aeruginosa pneumonia* induced 3 days after *S. aureus* sepsis (secondary pneumonia group) treated with blocking mAb anti-TNFR2 (Sepsis+ anti-TNFR2) or with isotype control at day 1 and day 3. Polynuclear infiltration was measured on lung sections collected 24 hours after *P. aeruginosa* pneumonia by anti-Ly6-G immunohistochemistry. Quantification of Ly6-G positive surface among lung tissue area by SIOX analysis of the slides. Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 4 mice per group).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5: TNFR2^{pos} T_{reg} cells in patients with severe sepsis

(a) Number of CD4⁺ T cells; number and frequency of FoxP3⁺CD4⁺ T cells in uninfected PBMC from healthy controls (HC), or 2 hours after *in vitro* infection with *S. aureus* (sepsis+). TNFR2 expression (MFI) on FoxP3⁺ CD4⁺ T cells and FoxP3⁻CD4⁺ T cells was also evaluated. Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 5 per group).

(b) Expression of CTLA-4, CD25 among TNFR2^{pos} T_{reg} (CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺) and TNFR2^{neg} T_{reg} cells of human PBMC from healthy controls (HC) after 2 hours of co-culture with *S. aureus* (sepsis+). Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 5 per group).

(c) Circulating lymphocyte cells (FSC/SSC) in patients suffering from septic choc compared to healthy controls (HC). Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 5 per group).

(d) Expression of FoxP3 among CD4⁺ T cells. Blood samples were collected 1, 4 and 7 days after the sepsis onset. Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 5 per group).

(e) Expression of CTLA-4 among T_{reg} (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) cells. Blood samples were collected 1, 4 and 7 days after the sepsis onset. Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 5 per group).

(f) Expression of CTLA-4 among TNFR2^{pos} T_{reg} and TNFR2^{neg} T_{reg} cells. Blood samples were collected 1, 4 and 7 days after the sepsis onset. Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n = 5 per group), each dot represents an independent biological replicate.

(g) FoxP3 immunohistochemistry in white pulp of spleen from patients without (upper panel) or with inflammatory response (lower panel). MagnificationX40 bar = 50µm. (n=5 patients without versus 6 patients with systemic inflammatory response. 10 fields per slide.

$*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

808 **Supplemental**

809 **Figure S1**

810 (a) Numeration of colony-forming units (CFU) per gram of spleen (CFU/g) and time course of
811 the bacterial load after *S. aureus* sepsis. Representative median $\pm$ SD from 2 independent
812 experiments (n=4 mice per group).

813 (b) Membrane expression of CD86 in splenic dendritic cell (DC) from mice not infected
814 (sepsis-) or in mice infected with *S. aureus* after 1 days (sepsis+). Representative median $\pm$
815 SD from 2 independent experiments (n=4-5 mice per group).

816 (c) Membrane expression of CD69 in splenic CD4+ T cell from mice not infected (sepsis-) or in
817 mice infected with *S. aureus* after 1 days (sepsis+). Representative medians $\pm$ SD from 2
818 independent experiments (n=4-5 mice per group).

819 (d) IL-1 β concentrations in spleen homogenates in non-infected (sepsis-) or 24 and 72 H after
820 *S. aureus* infection (sepsis+). Representative median $\pm$ SD of two independent experiments
821 (n = 4 mice per point).

822 (e) Lung sections were analyzed 72 H after *S. aureus* infection (Sepsis+) and in uninfected
823 mice (Sepsis-) to quantify neutrophil infiltration. All sections were stained with hematoxylin
824 and eosin (H&E) staining and observed at X20 magnification.

825 (f) Total surface of lung tissue 72H in mice after the *S. aureus* infection (Sepsis+) and in
826 uninfected mice (Sepsis-). Representative median $\pm$ SD of two independent experiments (n =
827 4 mice per group).

828 (g) Numeration of colony-forming units (CFU) per gram of lung (CFU/g) of *P. aeruginosa* 24h
829 H after *P. aeruginosa* pneumonia alone (pneumonia), 24 hours after *P. aeruginosa*
830 pneumonia and 72 H after *S. aureus* infection (Sepsis+ pneumonia). Representative median $\pm$
831 SD of two independent experiments (n = 4 mice per group).

Figure S2

(a) Principal component analysis of sepsis- T_{reg} (red) and sepsis+ T_{reg} (blue). PC1 and PC2 show the percentage of variance explained for 16,112 expressed genes.

(b) T_{reg} cell mRNA signature by gene set enrichment analysis performed on RNA-seq dataset of sepsis+ T_{reg} versus sepsis- T_{reg} cells with a gene set identified previously TNF α /NF- κ B (GSEA).

(c) T_{reg} cell mRNA signature by gene set enrichment analysis performed on RNA-seq dataset of sepsis+ T_{reg} versus sepsis- T_{reg} cells with a gene set identified previously IL-2/STAT5 (GSEA).

(d) Schematic diagram of the experimental outline of T_{reg} cells depletion by Diphteria toxin (DT), (DT 0.5 μ g i.p for the first injection, then 0.2 μ g i.p for the following injection, administrated +12H, day +1, +2, +3 after *S. aureus* sepsis). Frequency of T_{reg} cells among CD4+ T cells in spleen in uninfected mice (sepsis-), after 72H of *S. aureus* sepsis (sepsis+) and after 72H of *S. aureus* sepsis with T_{reg} cells depletion by Diphteria toxin in DERE mice (sepsis+ T_{reg} deletion). Representative median $\pm$ SD of three independent experiments, n = 4 per group.

(e) Polynuclear infiltration 24H after the pneumonia onset (Pneumonia), pneumonia at 3 days of sepsis (Sepsis+pneumonia) and 3 days after sepsis with T_{reg} cells depletion by Diphteria toxin in DERE mice (sepsis+pneumonia+DT). Representative median $\pm$ SD of 2 independent experiments, n = 4 mice per group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure S3

(a) IL-2/STAT5 pathway signature by gene set enrichment analysis performed on RNA-seq dataset of sepsis+ TNFR2^{pos}T_{reg} versus sepsis+ TNFR2^{neg}T_{reg} cells with a gene set identified previously (GSEA).

(b) Splenic CD4+ T cells and T_{reg} cells proportions and numbers from mice infected (sepsis+) or not (sepsis-) in Wild Type (WT) or TNFR2KO mice. Representative dot plots (left panels) and median $\pm$ SD from 2 independent experiments (n = 5 mice per group).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

880 **References**

- 881 1. Delano, M. J. & Ward, P. A. Sepsis-induced immune dysfunction: can
882 immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest* **126**, 23–31 (2016).
- 883 2. Shankar-Hari, M. *et al.* Developing a New Definition and Assessing New
884 Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus
885 Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). in **315**, 775–787 (2016).
- 886 3. van Vught, L. A. *et al.* Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality
887 of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for
888 Sepsis. *JAMA* **315**, 1469–1479 (2016).
- 889 4. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis:
890 a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach.
891 *Lancet Infect Dis* **13**, 260–268 (2013).
- 892 5. Schwulst, S. J. *et al.* Agonistic monoclonal antibody against CD40 receptor
893 decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J*
894 *Immunol* **177**, 557–565 (2006).
- 895 6. Boomer, J. S. *et al.* Immunosuppression in patients who die of sepsis and
896 multiple organ failure. *JAMA* **306**, 2594–2605 (2011).
- 897 7. Hotchkiss, R. S. *et al.* Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by
898 both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol* **174**,
899 5110–5118 (2005).
- 900 8. Hotchkiss, R. S. *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock,
901 and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* **27**, 1230–1251 (1999).
- 902 9. Drewry, A. M. *et al.* Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis
903 predicts mortality. *Shock* **42**, 383–391 (2014).
- 904 10. Inoue, S. *et al.* Reduction of immunocompetent T cells followed by
905 prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Crit Care Med* **41**,
906 810–819 (2013).
- 907 11. Venet, F. *et al.* Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of
908 septic shock. *Shock* **34**, 358–363 (2010).
- 909 12. Small, T. N. *et al.* Comparison of immune reconstitution after unrelated
910 and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of
911 patient age and donor leukocyte infusions. *Blood* **93**, 467–480 (1999).
- 912 13. Savani, B. N. *et al.* Absolute lymphocyte count on day 30 is a surrogate for
913 robust hematopoietic recovery and strongly predicts outcome after T cell-
914 depleted allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow*
915 *Transplant.* **13**, 1216–1223 (2007).
- 916 14. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced
917 immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy.
918 *Nature Reviews Immunology* **13**, 862–874 (2013).

15. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**, 600–603 (2011).
16. Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. & Sacks, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* **420**, 502–507 (2002).
17. Venet, F. *et al.* Human CD4+CD25+ Regulatory T Lymphocytes Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Monocyte Survival through a Fas/Fas Ligand-Dependent Mechanism. *J Immunol* **177**, 6540–6547 (2006).
18. Cavassani, K. A. *et al.* The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood* **115**, 4403–4411 (2010).
19. Venet, F. *et al.* Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)/CD25(+)/CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* **35**, 678–686 (2009).
20. Roquilly, A. *et al.* Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity* **47**, 135–147.e5 (2017).
21. Pugh, A. M., Auteri, N. J., Goetzman, H. S., Caldwell, C. C. & Nomellini, V. A Murine Model of Persistent Inflammation, Immune Suppression, and Catabolism Syndrome. *Int J Mol Sci* **18**, 1741 (2017).
22. Delano, M. J. & Moldawer, L. L. The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. *Nutr Clin Pract* **21**, 68–81 (2006).
23. Cretney, E. *et al.* The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nature Publishing Group* **12**, 304–311 (2011).
24. Vasanthakumar, A. *et al.* The TNF Receptor Superfamily-NF- κ B Axis Is Critical to Maintain Effector Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues. *CellReports* 1–16 (2017).
doi:10.1016/j.celrep.2017.08.068
25. Levine, A. G., Arvey, A., Jin, W. & Rudensky, A. Y. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nature Publishing Group* **15**, 1070–1078 (2014).
26. Kitagawa, Y. & Sakaguchi, S. Molecular control of regulatory T cell development and function. *Curr Opin Immunol* **49**, 64–70 (2017).
27. Spence, A., Klementowicz, J. E., Bluestone, J. A. & Tang, Q. Targeting Treg signaling for the treatment of autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* **37**, 11–20 (2015).
28. Salomon, B. L. *et al.* Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front Immunol* **9**, i6–12 (2018).

29. Chen, X. *et al.* Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol* **180**, 6467–6471 (2008).
30. Koh, A. Y., Priebe, G. P., Ray, C., Van Rooijen, N. & Pier, G. B. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun* **77**, 5300–5310 (2009).
31. François, B. *et al.* Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* **3**, (2018).
32. Venet, F. *et al.* Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Crit Care Med* **41**, 111–119 (2013).
33. Wisnoski, N., Chung, C.-S., Chen, Y., Huang, X. & Ayala, A. The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock* **27**, 251–257 (2007).
34. Kurup, S. P. *et al.* Regulatory T cells impede acute and long-term immunity to blood-stage malaria through CTLA-4. *Nat Med* **23**, 1220–1225 (2017).
35. Venet, F. *et al.* Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol* **83**, 523–535 (2008).
36. Cretney, E., Kallies, A. & Nutt, S. L. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol* **34**, 74–80 (2013).
37. Kühnhorn, F. *et al.* Foxp3+ regulatory T cells are required for recovery from severe sepsis. *PLoS ONE* **8**, e65109 (2013).
38. Okeke, E. B., Okwor, I., Mou, Z., Jia, P. & Uzonna, J. E. CD4+CD25+ regulatory T cells attenuate lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory responses and promotes survival in murine *Escherichia coli* infection. *Shock* **40**, 65–73 (2013).
39. Jia, W. *et al.* Regulatory T cells are protective in systemic inflammation response syndrome induced by zymosan in mice. *PLoS ONE* **8**, e64397 (2013).
40. Heuer, J. G. *et al.* Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis. *J Immunol* **174**, 7141–7146 (2005).
41. Cohen, J. L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D. & Salomon, B. L. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* **196**, 401–406 (2002).
42. Scumpia, P. O. *et al.* Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* **177**, 7943–7949 (2006).

43. Kalekar, L. A. *et al.* CD4(+) T cell anergy prevents autoimmunity and generates regulatory T cell precursors. *Nature Publishing Group* **17**, 304–314 (2016).
44. Hori, S. Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **259**, 159–172 (2014).
45. Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H. & Allison, J. P. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* **356**, 607–609 (1992).
46. Greenwald, R. J., Boussiotis, V. A., Liorbach, R. B., Abbas, A. K. & Sharpe, A. H. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* **14**, 145–155 (2001).
47. Fife, B. T. *et al.* Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nature Publishing Group* **10**, 1185–1192 (2009).
48. Akkaya, B. *et al.* Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nature Publishing Group* 1–19 (2019). doi:10.1038/s41590-018-0280-2
49. Tomura, M. *et al.* Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest* **120**, 883–893 (2010).
50. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330–336 (2003).
51. Bernard, G. R. *et al.* Evaluating the efficacy and safety of two doses of the polyclonal anti-tumor necrosis factor- α fragment antibody AZD9773 in adult patients with severe sepsis and/or septic shock: randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIb study*. *Crit Care Med* **42**, 504–511 (2014).
52. Abraham, E. *et al.* p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. Ro 45-2081 Study Group. *JAMA* **277**, 1531–1538 (1997).
53. Chen, X. & Oppenheim, J. J. Targeting TNFR2, an immune checkpoint stimulator and oncoprotein, is a promising treatment for cancer. *Sci Signal* **10**, eaal2328 (2017).
54. Govindaraj, C. *et al.* Lenalidomide-based maintenance therapy reduces TNF receptor 2 on CD4 T cells and enhances immune effector function in acute myeloid leukemia patients. *Am. J. Hematol.* **89**, 795–802 (2014).

- 1037 55. Leclerc, M. *et al.* Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF
1038 produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells. *Blood* **128**,
1039 1651–1659 (2016).
- 1040 56. Chopra, M. *et al.* Tumor necrosis factor receptor 2-dependent
1041 homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental
1042 metastasis. *Carcinogenesis* **34**, 1296–1303 (2013).
- 1043 57. Chen, X. *et al.* TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+
1044 regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol*
1045 **190**, 1076–1084 (2013).
- 1046 58. Miyazaki, T. *et al.* Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-
1047 2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* **81**,
1048 223–231 (1995).
- 1049 59. Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. & Carbone, F. R. Defective TCR
1050 expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and
1051 beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements.
1052 *Immunol. Cell Biol.* **76**, 34–40 (1998).
- 1053 60. Wang, Y. *et al.* Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice
1054 unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the
1055 action of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* **180**, 1565–1575 (2008).
- 1056 61. Broquet, A. *et al.* Depletion of Natural Killer Cells Increases Mice
1057 Susceptibility in a Pseudomonas aeruginosa Pneumonia Model. *Crit Care*
1058 *Med* **1** (2014). doi:10.1097/CCM.0000000000000311
- 1059 62. Jourden, L., Bernard, M., Dillies, M.-A. & Le Crom, S. Eoulsan: a cloud
1060 computing-based framework facilitating high throughput sequencing
1061 analyses. *Bioinformatics* **28**, 1542–1543 (2012).
- 1062 63. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*
1063 **29**, 15–21 (2013).
- 1064 64. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.
1065 *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
- 1066 65. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq--a Python framework to work
1067 with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169
1068 (2015).
- 1069 66. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change
1070 and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550
1071 (2014).
- 1072 67. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based
1073 approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl*
1074 *Acad Sci USA* **102**, 15545–15550 (2005).

- 1075 68. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative
1076 phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat.*
1077 *Genet.* **34**, 267–273 (2003).
- 1078 69. Chen, J., Bardes, E. E., Aronow, B. J. & Jegga, A. G. ToppGene Suite for
1079 gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic*
1080 *Acids Res.* **37**, W305–11 (2009).
- 1081

Figure 1

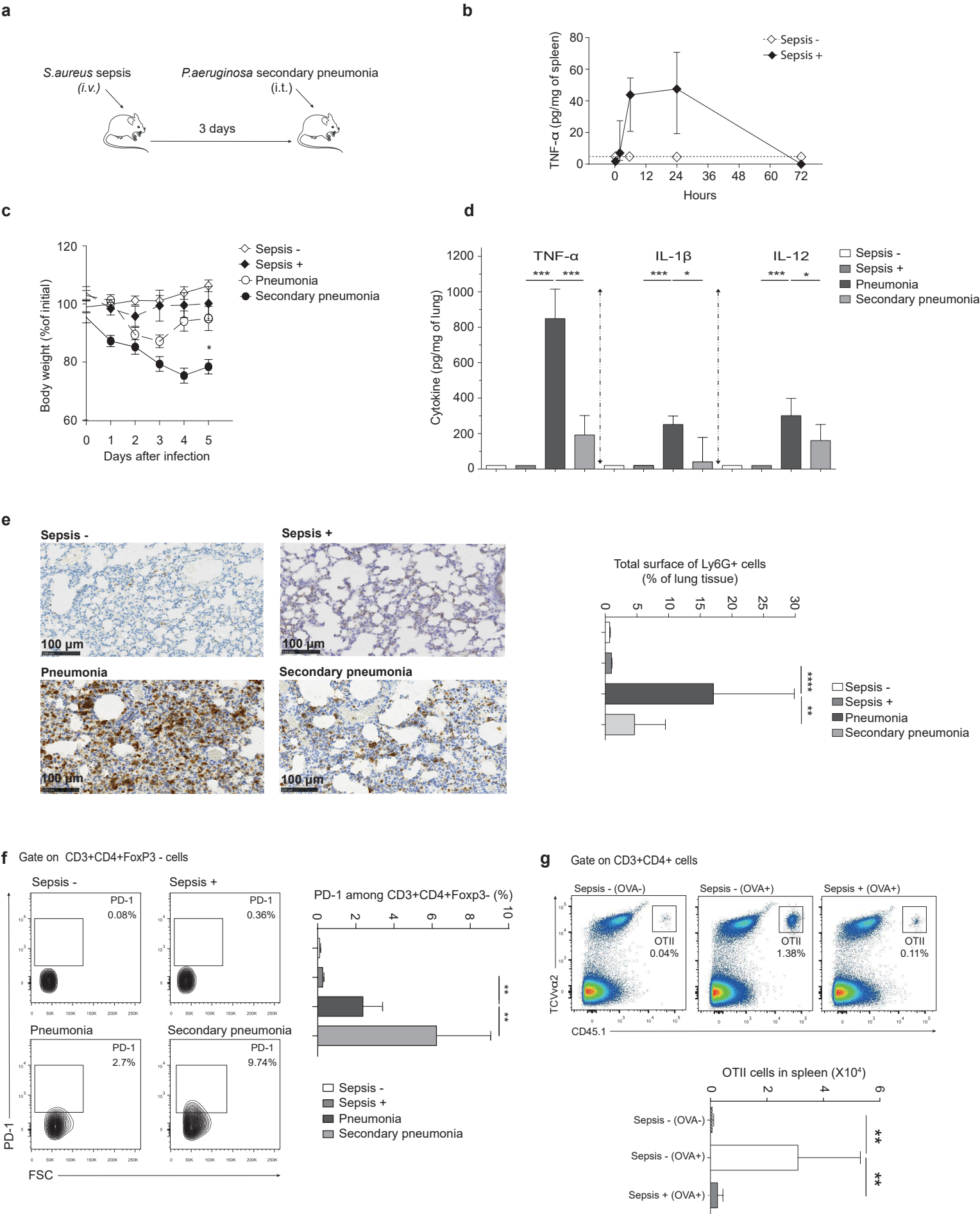


Figure 2

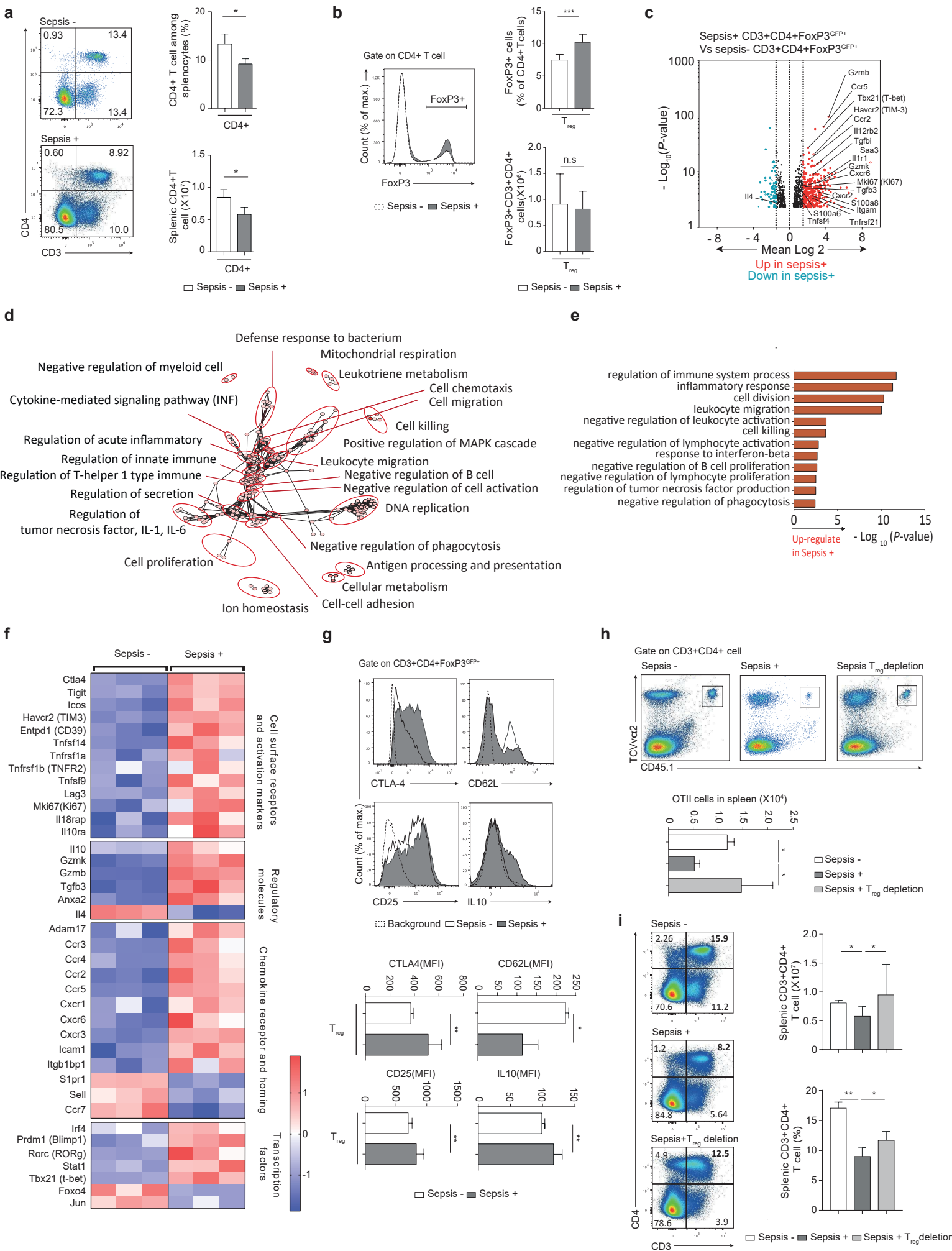


Figure 3 a

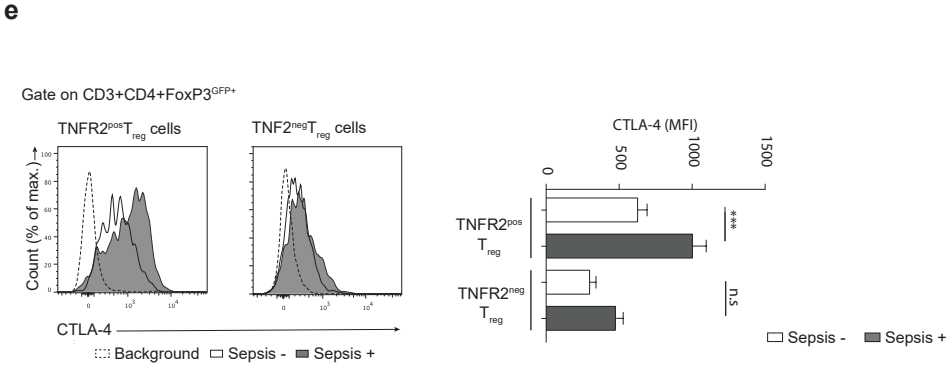
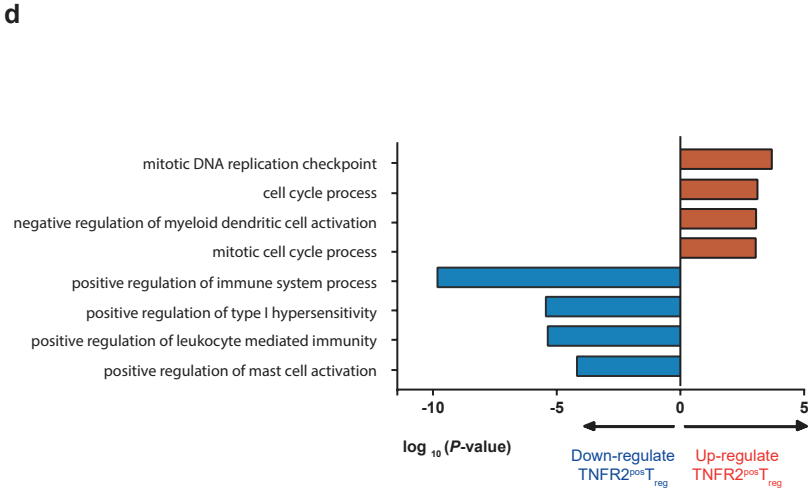
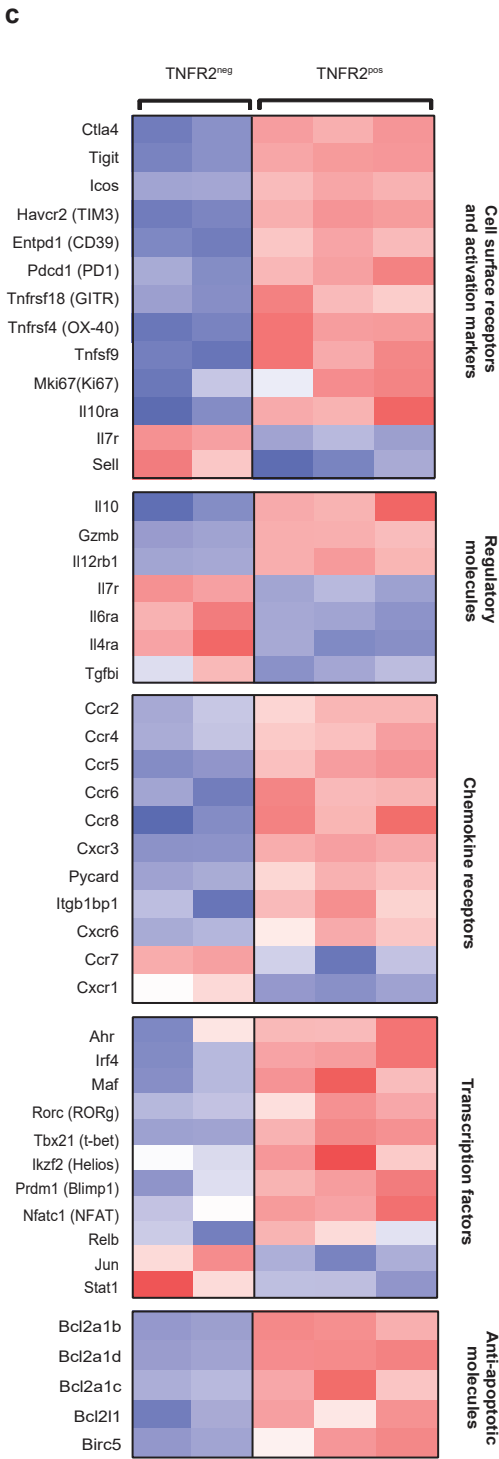
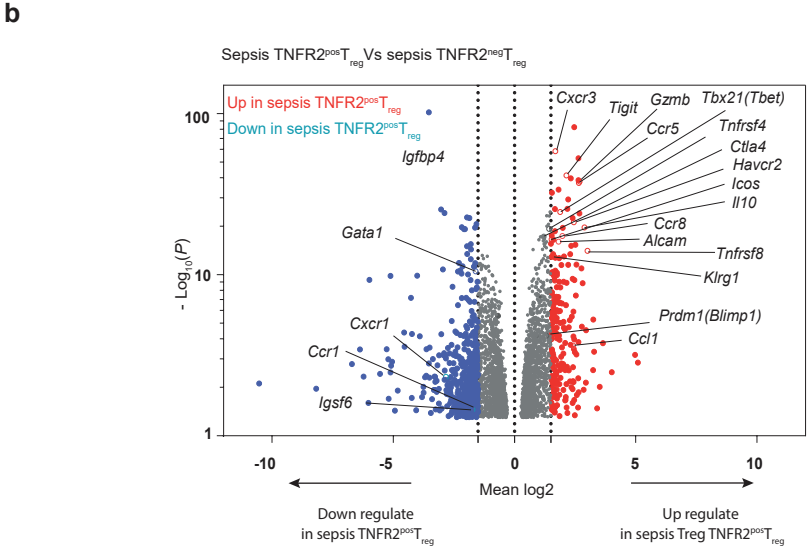
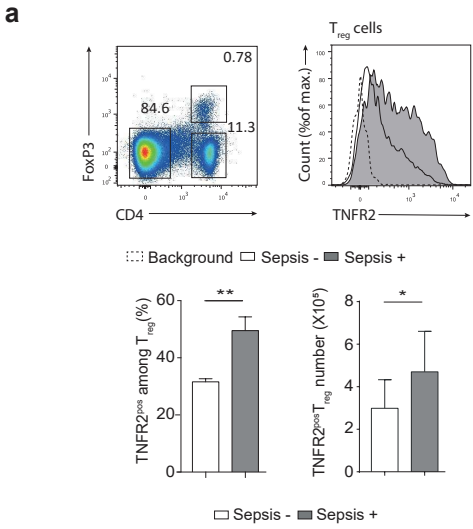
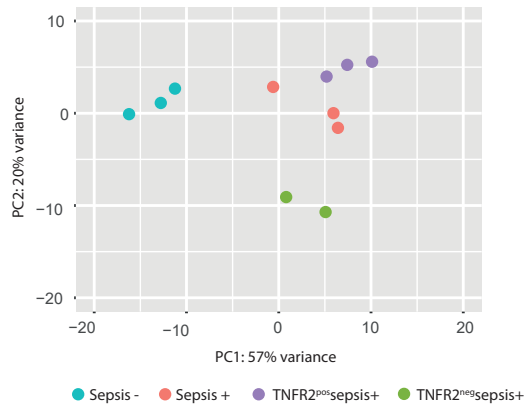
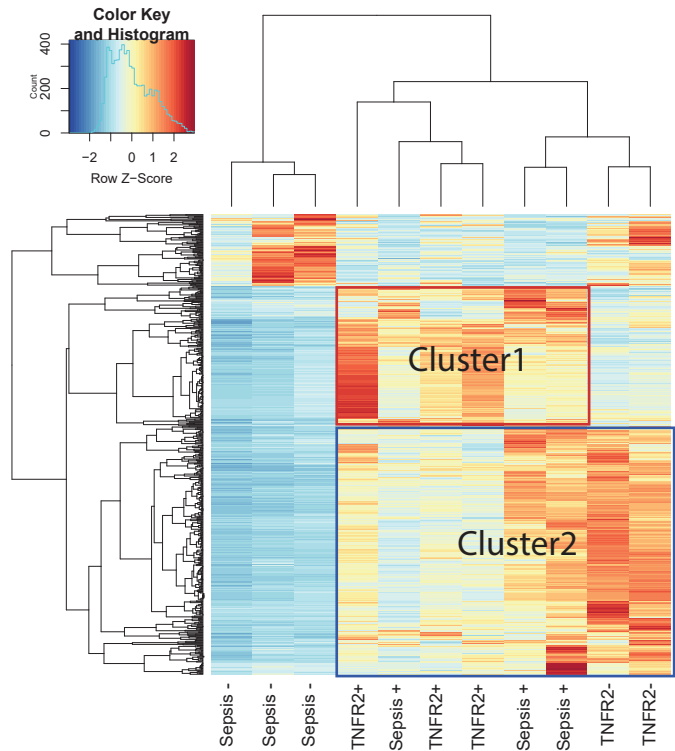


Figure 3 b

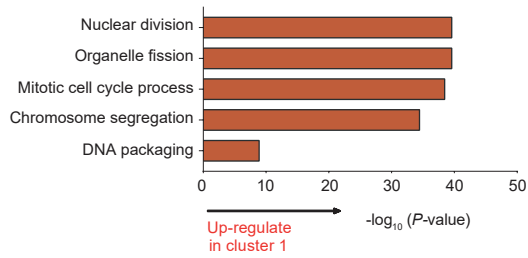
f



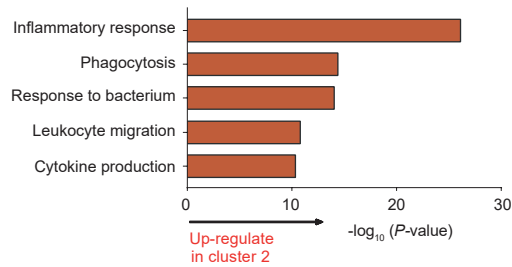
g



h

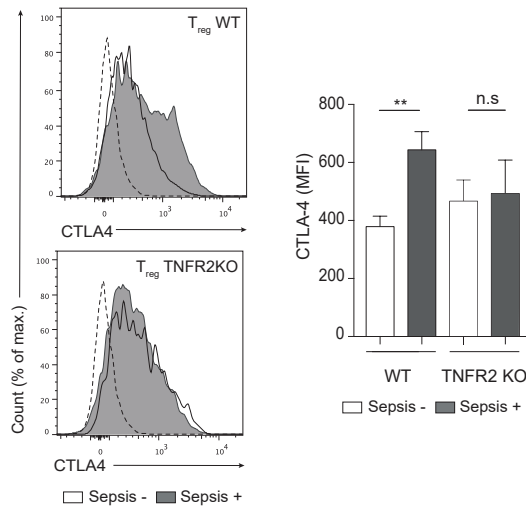


i



j

Gate on CD3+CD4+FoxP3+



k

Gate on CD3+CD4+ T cell

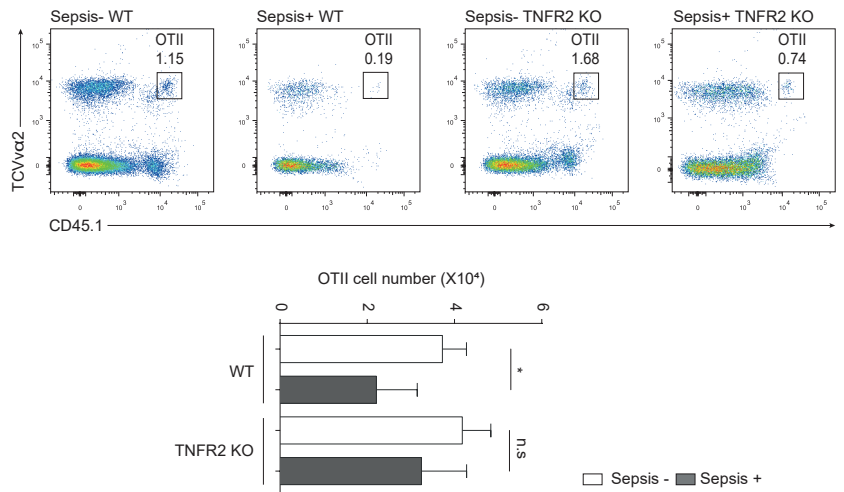


Figure 4

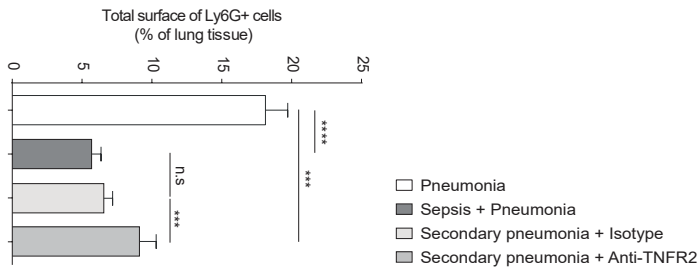
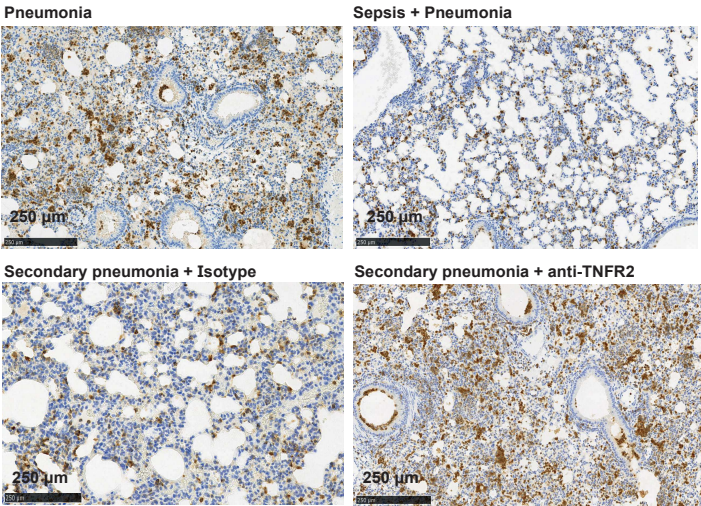
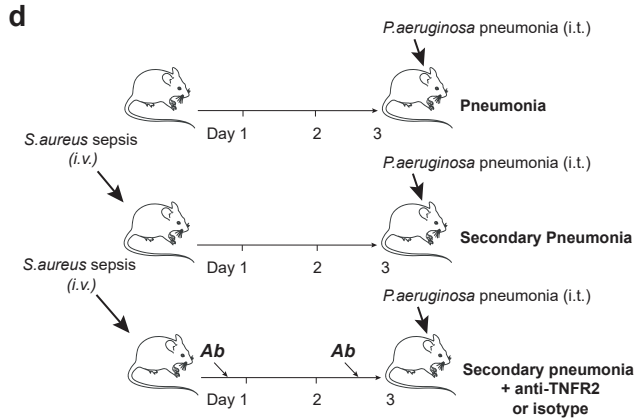
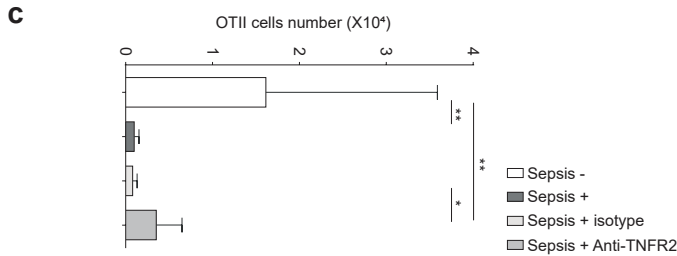
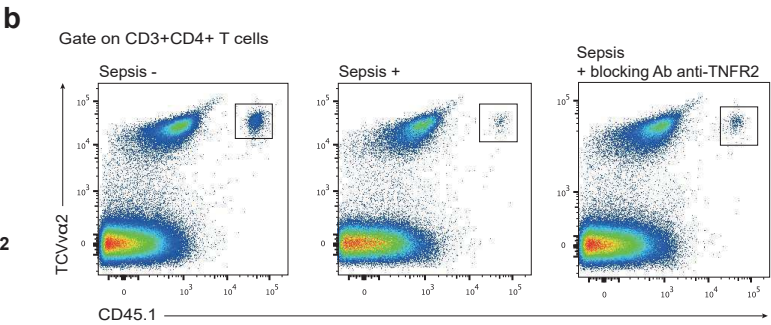
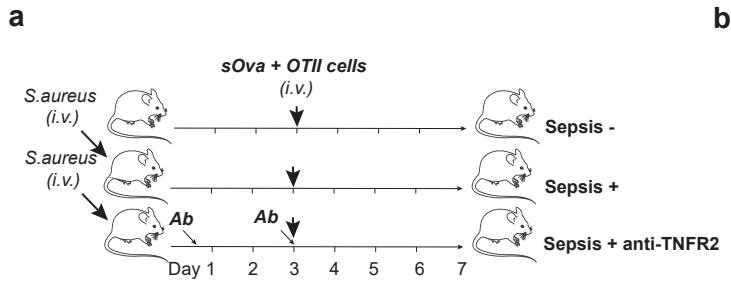


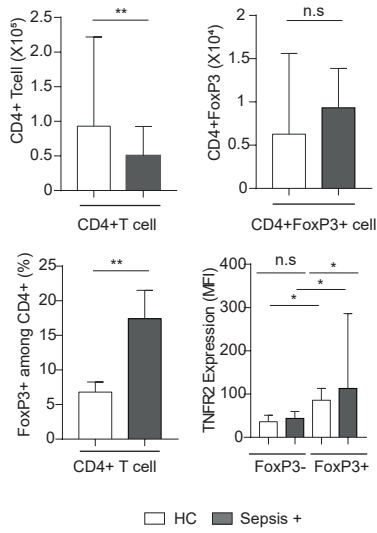
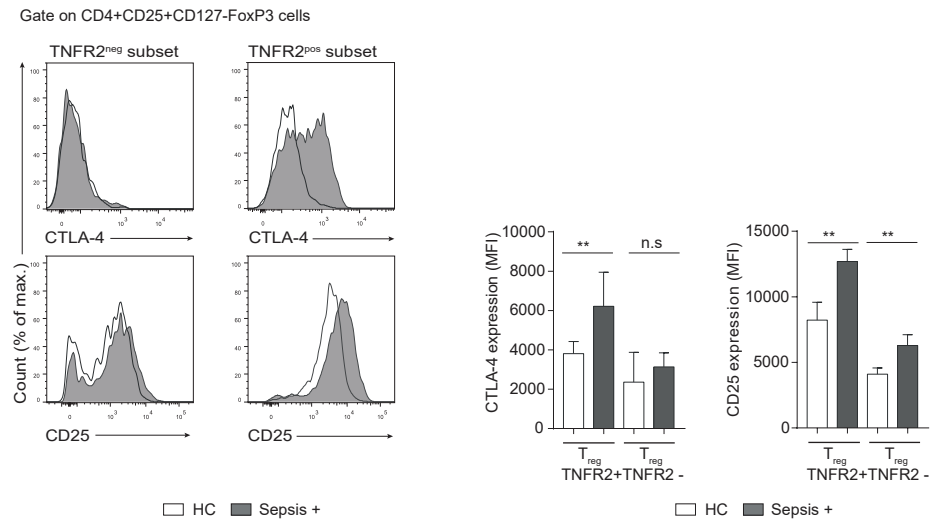
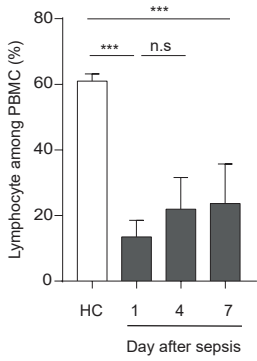
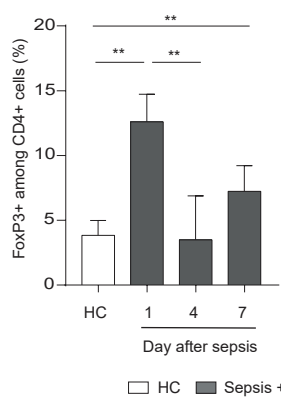
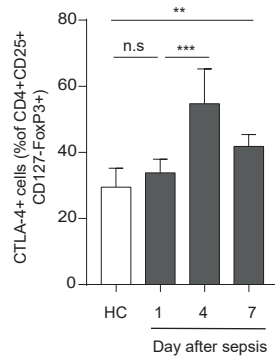
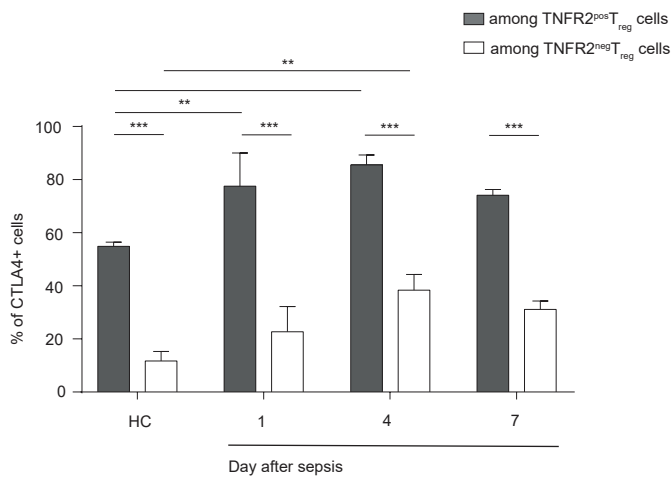
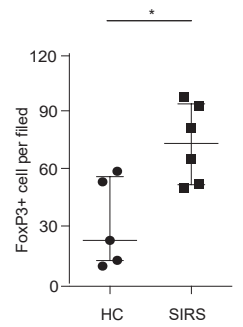
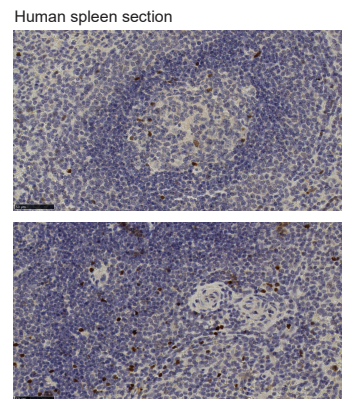
Figure 5**a****b****c****d****e****f****g**

Figure S 1

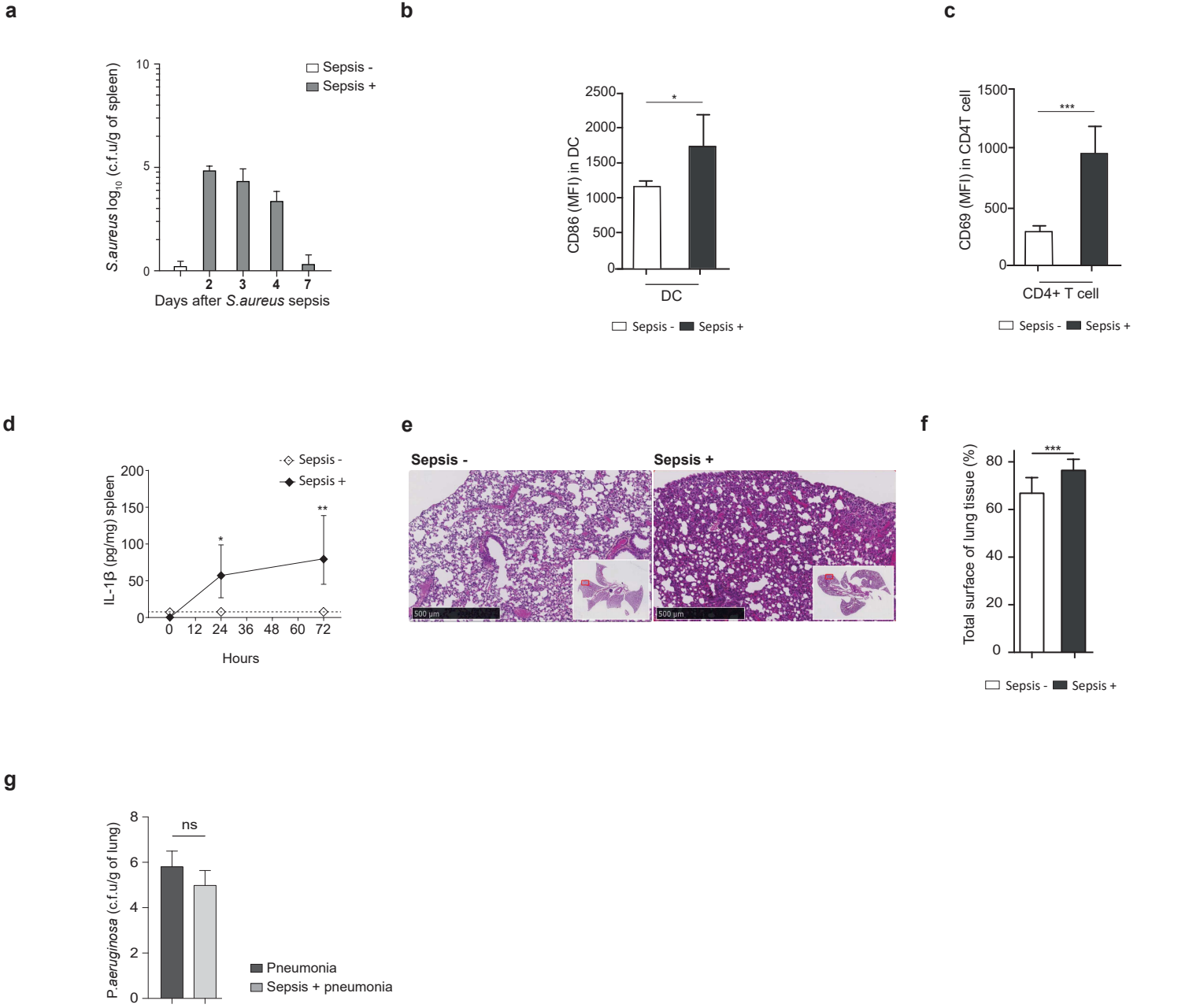
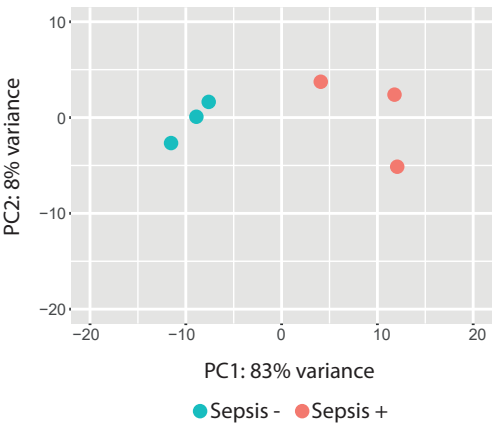
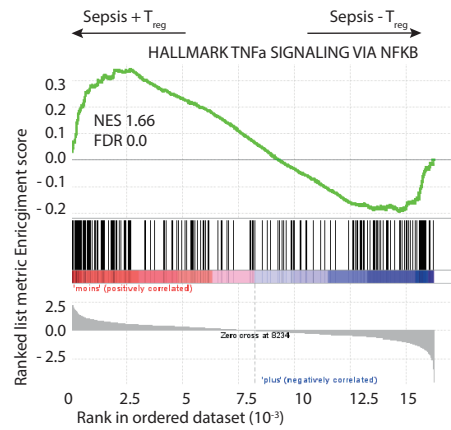


Figure S 2

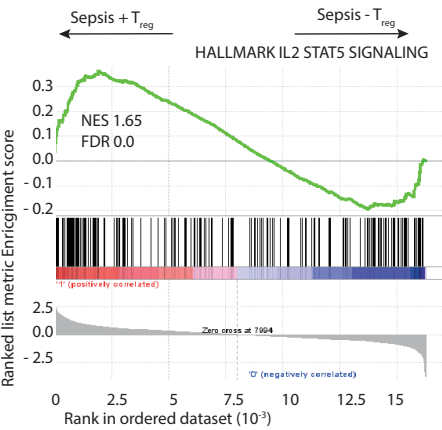
a



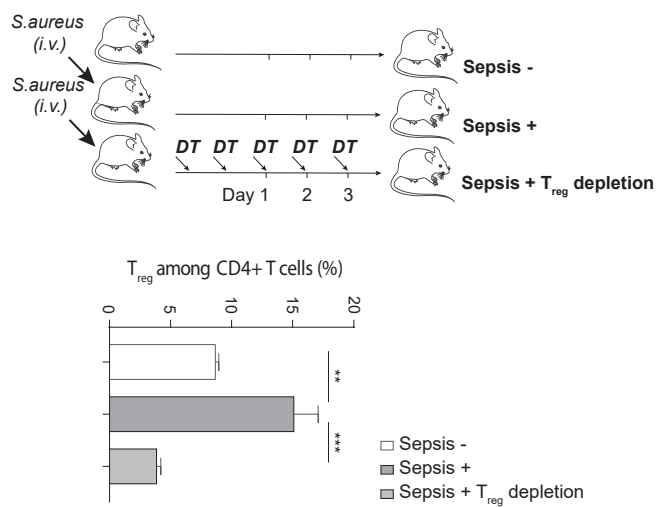
b



c



d



e

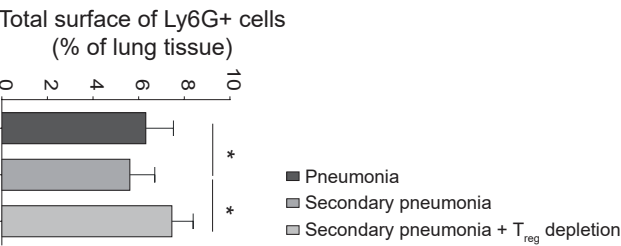
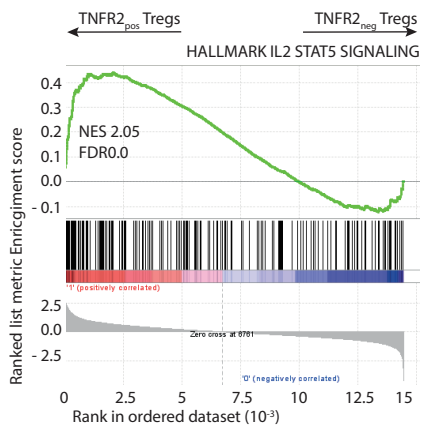


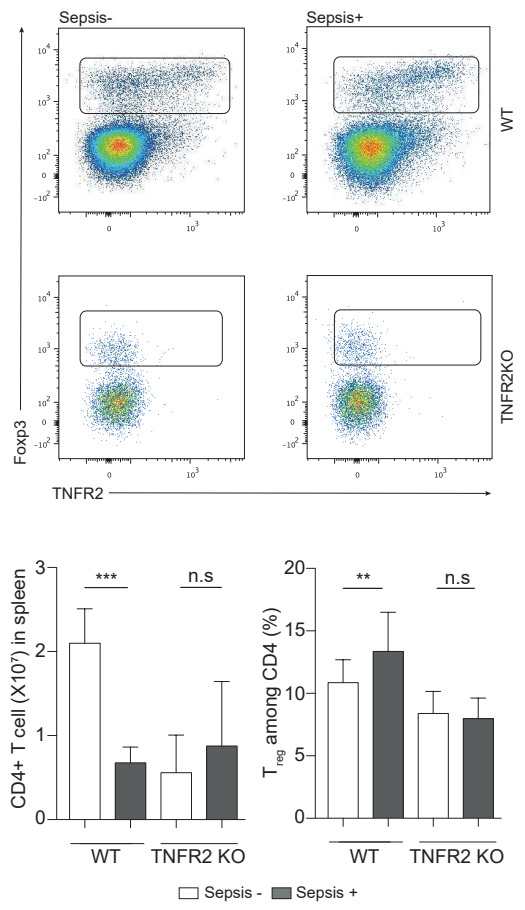
Figure S 3

a



b

Gate on CD3+CD4+Foxp3+ cells



Titre : Les lymphocytes Treg et le sous type Treg TNFR2 jouent un rôle central au cours de l'immunodépression post-septique médiée par les lymphocytes CD4+

Mots clés : Treg, sepsis, immunosuppression, TNFR2

Résumé : Le sepsis est fréquemment responsable d'une immunosuppression induite par l'inflammation, qui est une cause importante de pneumonie acquise à l'hôpital. Une altération sévère des lymphocytes CD4+ est une caractéristique de l'IS post-septique. Nous avons cherché à déterminer comment les cellules Treg modifient les lymphocytes T CD4+ et leur rôle dans l'augmentation de susceptibilité de l'hôte à une pneumopathie bactérienne secondaire. Tout d'abord, nous avons montré dans la souris que le ratio Treg (lymphocytes Treg/CD4+) est augmenté pendant le sepsis par une diminution importante des lymphocytes T CD4+ plutôt que par une augmentation du nombre de Treg. Les Treg provenant d'animaux septiques présentaient un phénotype activé (expression CTLA4). En utilisant des souris DEREK et OTII, nous avons confirmé que les Treg au cours du sepsis contribuaient à une altération des lymphocytes T CD4+ et altéraient les défenses contre une pneumopathie secondaire.

Le séquençage de l'ARN des populations Treg a suggéré un rôle important des TregTNFR2. En utilisant des souris TNFR2 knock-out et en ciblant le TNFR2 avec un anticorps monoclonal bloquant, nous avons confirmé le rôle critique de ce récepteur dans l'immunosuppression observée après sepsis. Ces observations sont corroborées par les résultats retrouvés chez une population de patients pris en charge pour choc septique. Chez ces patients, nos données correspondent à celles obtenues chez la souris : 1) la diminution importante des lymphocytes T CD4+ et le nombre conservé de Treg ; 2) le nombre de Treg TNFR2 activés (CTLA4) est augmenté chez les patients septiques. Le Treg est un acteur essentiel dans le traitement de l'immunodépression induite par le sepsis. Le TNFR2 pourrait être considéré comme une cible thérapeutique potentielle pour traiter l'immunosuppression induite par le sepsis et donc la sensibilité à la pneumonie acquise à l'hôpital.

Title : Treg cells and the TNFR2pos Treg subset play a major role in sepsis-induced CD4+ T cell impairment

Keywords : Treg, sepsis, immunosuppression, TNFR2

Résumé : Sepsis causes inflammation-induced immunosuppression (IS), which is an important cause of hospital-acquired pneumonia. A severe depletion of the CD4+ lymphocytes compartment is a hallmark of post-septic IS and we sought to investigate whether and how Treg cells alter the CD4+ T cell compartment and render the septic host prone to a secondary bacterial pneumonia. First we showed in mice that the Treg ratio (Treg/CD4+ T lymphocytes) is enhanced during sepsis through a dramatic decrease of CD4+ T cells rather than an increased number of Treg. Treg from septic animals presented an activated phenotype (CTLA4 expression). Using DEREK and OTII mice, we confirmed that Treg induce a CD4+ T cell impairment and alter the defenses against pneumonia.

A RNA sequencing analysis of Treg suggested an important role of TNFR2pos Treg and by using knock-out TNFR2 mice and targeting TNFR2 with a blocking monoclonal antibody, we could confirm the critical role of this receptor in the immunosuppression observed after sepsis. These observations were translated to septic patients suffering systemic inflammation. In these patients, our data paralleled those obtained in mice: 1) the important decrease of CD4+ T cells and the conserved number of Treg; 2) the number of activated (CTLA4) TNFR2pos Treg was dramatically increased in septic patients. Treg is a critical player in sepsis-induced IS, and TNFR2 could be considered as a potential therapeutic target to overcome sepsis-induced immunosuppression and therefore susceptibility to hospital-acquired pneumonia.