

Thèse de Doctorat

Tiphaine RUGGERI

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : *Biologie, Médecine, Santé*

Spécialité : *Biologie des organismes*

Unité de recherche : INSERM UMR 1232, Centre de Recherche en Cancérologie, Nantes-Angers

Soutenue le 05/03/2018

Thèse N° :

Validation d'un modèle murin de traumatisme médullaire entraînant une immunodépression, et évaluation d'une immunothérapie par un anticorps anti-PD-1

JURY

Rapporteurs : **Samir JABER**, MD, PhD, PUPH, Université de Montpellier
Catherine PAUGAM, MD, PhD, PUPH, Hôpital de Beaujon

Président du jury : **Laetitia GAUTREAU**, PhD, MCU, Université de Nantes

Directeur de Thèse : **Frédéric ALTARE**, PhD, Directeur de Recherche, CRCINA Inserm 1232

Co-directeur de Thèse : **Karim ASEHNOUNE**, MD, PhD, PUPH, Université de Nantes

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury, je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail.

A Frédéric ALTARE, qui m'a fait l'honneur d'être le directeur de ma thèse. J'ai toujours eu plaisir à discuter avec toi.

A Karim ASEHNOUNE, qui m'a fait l'honneur d'être co-directeur de ma thèse. Merci de m'avoir guidée dans le monde de la recherche.

A Cédric, qui a encadré ma thèse. Je te remercie pour tes conseils techniques et scientifiques, et pour l'aide que tu m'as apporté tout au long de mon doctorat.

A Anissa, ma voisine de bureau avec qui j'ai pu tout partager les joies et les déceptions des manip au quotidien, le café et les petits gâteaux... D'avoir toujours un petit mot, un sourire pour mettre la bonne humeur dans notre bureau.

A Virginie, à notre amitié qui est née au sein du laboratoire. Merci pour tous ces moments de complicité, pour tous tes conseils scientifiques, professionnels et personnels.

A Isabelle, pour toutes tes aides administratives et pour ta bonne humeur. Merci pour tous ces moments de complicité, et surtout un grand merci pour tous ces ateliers de rigologie.

A tous les autres membres de l'équipe EA3826, et tout particulièrement à Alexis, Raymonde, Sandy et Marion, je vous remercie pour votre aide, pour les fous rires et le partage humain.

A Euloge et Adrien de l'équipe 5 de l'unité Inserm U1232, pour votre soutien et pour nos échanges toujours dans la bonne humeur.

Aux doctorants du projet ARMINA, avec qui j'ai pu partager des moments des fous rires pendant nos cours de communications, et lors des congrès DMI.

A mes amis, pour notre amitié, pour nos soirées partagées. Pour tous ces moments où vous m'avez soutenue, encouragée.

A mes grognasses, pour notre éternelle amitié.

A ma mère et à mon frère, vous avez toujours été présents et vous m'avez toujours soutenu.

A Benjamin, mon cher et tendre qui m'a aimée, soutenue, réconfortée, aidée et motivée pendant ces années. Merci d'avoir toujours eu confiance en ma persévérance.

A Thomas, mon petit amour qui nous comble de bonheur depuis déjà 2 ans.

Table des matières

TABLE DES FIGURES	6
TABLE DES TABLEAUX.....	9
TABLE DES ABRÉVIATIONS	10
PRÉAMBULE.....	13
INTRODUCTION.....	16
I- Traumatismes sévères	16
1- Traumatologie générale.....	16
1.1 Épidémiologie	16
2- La lésion médullaire haute (SCI : « Spinal Cord Injury »)	17
2.1 Épidémiologie	17
2.2 La Synapse : Système nerveux central (SNC)/Système immunitaire	18
II- Immunosuppression induite par un stress aigu	23
1- Réponse immunitaire induite par un stress	23
1.1 SIRS-CARS syndrome	23
2- L'immunité innée et adaptative dans l'immunosuppression.....	24
2.1 Définition générale de l'immunosuppression.....	24
2.2 Les altérations de la réponse immunitaire innée durant l'immunosuppression consécutives à un traumatisme sévère.....	26
2.2.1 Tolérance au LPS	26
2.2.2 Le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II ou HLA) ...	28
2.2.3 Les Cellules Lymphoïdes Innées (ILCs).....	28
2.2.3.1 Les cellules Natural Killer (NK)	30
2.2.3.2 Les lymphocytes NKT	32
2.3 Les altérations de la réponse immunitaire adaptative durant l'immunosuppression suite à un traumatisme sévère.....	35
2.3.1 Lymphopénie et lymphocytes T régulateurs.....	36
2.3.2 Phénomène d'épuisement lymphocytaire T	36
2.3.3 PD-1 : le récepteur 1 de mort programmée.....	38
III- Modèles de traumatisme médullaire et traitements.....	42
1- Le modèle de traumatisme médullaire	42
1.1 Localisation de la lésion médullaire.....	43
1.2 Syndrome d'immunosuppression après un traumatisme médullaire (SCI-IDS)	45

2-	Molécules activatrices du système immunitaire inné pour traiter l'IS du patient de réanimation.....	46
2.1	Thérapies classiques en traumatologie : IFN- γ , GM-CSF, MPLA, hydrocortisone	46
2.1.1	L'IFN- γ	46
2.1.2	Le GM-CSF.....	47
2.1.3	Le MPLA.....	47
2.1.4	L'hydrocortisone	48
2.2	Nouveau traitement : L'immunothérapie par anticorps bloquant anti-PD-1.....	48
2.2.1	L'immunothérapie en cancérologie.....	48
2.2.2	L'immunothérapie en traumatologie.....	49
	MATÉRIEL ET MÉTHODE	52
1-	Soins aux animaux	52
2-	Analgésie et euthanasie des animaux	52
3-	Protocole chirurgical de lésion médullaire (SCI).....	52
4-	Protocole de pneumonie	53
5-	Groupes d'animaux durant l'étude	54
6-	Coupe histologique et plugin SIOX dans le logiciel Fiji	54
7-	Croissance et dissémination bactérienne.....	54
8-	Préparation de l'homogénat de poumons et de rate pour test ELISA et détermination du niveau de cytokine par échantillon.....	55
9-	Évaluation de la production de TNF- α par les cellules du sang en présence de LPS ..	55
10-	Détermination de l'expression des ARNm IL-12, IFN- γ et IL-10 par qRT-PCR dans les cellules CD11c spléniques	55
11-	Suspension cellulaire de splénocytes.....	57
12-	Marquage des splénocytes pour la cytométrie en flux.....	57
13-	Traitement anticorps anti-PD1.....	58
14-	Analyse statistique	59
	RÉSULTATS	61
1-	La lésion médullaire thoracique haute sensibilise à une pneumonie à SASM.....	61
1.1	La lésion médullaire haute (SCI)	61
1.2	Le traumatisme médullaire sensibilise les animaux à une pneumonie à SASM	62
2-	Inflammation du tissu pulmonaire suite à une pneumonie à SASM avec ou sans lésion médullaire préalable.....	64
2.1	Œdème /infiltration cellulaire et charge bactérienne.....	64

2.2	Augmentation de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α dans les poumons, suite à une pneumonie à SASM, 3 jours après une lésion médullaire.....	66
3-	Réponse précoce inflammatoire suite au traumatisme médullaire.....	68
4-	Réponse tardive anti-inflammatoire et mise en place d'une immunosuppression suite à la lésion médullaire	71
4.1	Diminution de la taille et du poids des rates, et lymphopénie des animaux lésés	71
4.2	Augmentation de la cytokine anti-inflammatoire IL-10.....	73
4.3	Diminution de la production de TNF- α après stimulation <i>ex vivo</i> par du LPS de cultures de sang total	74
4.4	Épuisement lymphocytaire et surexpression de PD-1 sur les lymphocytes T spléniques après une lésion médullaire.	75
5-	Marqueurs d'immunosuppression chez les souris SCI après une pneumonie à SASM	77
5.1	Balance IFN- γ et IL-10 après une lésion médullaire suivi d'une pneumonie à SASM	77
5.2	Diminution de l'expression du CMH-II après une lésion médullaire et une pneumonie à SASM	78
6-	L'immunothérapie par un anticorps anti-PD1 dans le modèle de traumatisme médullaire.....	80
6.1	Effet dose de l'immunothérapie par l'anticorps anti-PD1	80
6.2	L'anticorps anti-PD1 augmente la population des lymphocytes NKT spléniques et la production d'IFN- γ par les NKT chez les souris SCI.....	83
	DISCUSSION	88
1-	Le modèle murin d'immunosuppression suite à une lésion médullaire haute	88
2-	Résultats principaux	94
2.1	La validation du modèle de traumatisme médullaire	94
2.2	PD-1 marqueur d'épuisement lymphocytaire T	99
2.3	L'immunothérapie par anti-PD-1	100
3.	Perspectives	104
	BIBLIOGRAPHIE	108
	Article.....	135

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Communication bidirectionnelle des systèmes nerveux et immunitaire (Meisel et al. 2005).....	19
Figure 2 : Une lésion au niveau du cerveau ou de la moelle épinière entraîne une suppression de la fonction immunitaire tout en activant une cascade inflammatoire. (Popovich and McTigue 2009).....	20
Figure 3 : Schéma résumant les évènements physiopathologiques qui mènent de la lésion du système nerveux central (CNS) à l'infection, suite à un traumatisme sévère (Meisel et al. 2005).....	22
Figure 4 : Un traumatisme sévère induit une activation de la réponse immunitaire innée par la production de cytokines pro et anti-inflammatoires. (Asehnoune, Roquilly, and Abraham 2012).....	23
Figure 5: Réponse immunologique pendant un sepsis, avec une réponse pro-inflammatoire prédominante au début, puis tardivement une réponse anti-inflammatoire prédomine (Hotchkiss et al. 2009).....	24
Figure 6: Activation des lymphocytes T par les trois signaux de co-stimulation suite à l'interaction avec les cellules présentatrices d'antigène (APC).....	25
Figure 7: Voie de signalisation des TLRs des mammifères (O'Neill, Golenbock, and Bowie 2013)	27
Figure 8: Classification des ILCs en 3 groupes basée sur leurs caractéristiques fonctionnelles (Spits et al. 2013).....	29
Figure 9: Sous-types de cellules NK humaines. (Farag and Caligiuri 2006).	30
Figure 10: Interaction entre les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes Natural Killer (NK), dans le cas d'une infection systémique ou locale (Vivier and Ugolini 2009) 31	31
Figure 11: Les cellules NKT de souris partagent certaines caractéristiques avec les cellules NK et T. (Godfrey et al. 2000).	32
Figure 12: Réseau d'interaction moléculaire et cellulaire des cellules NKT dans la réponse immunitaire (Bendelac, Savage, and Teyton 2007)	34
Figure 13: Hiérarchie d'apparition des marqueurs d'épuisement lymphocytaire pendant une infection chronique (Wherry 2011).....	38

Figure 14: Interaction des voies de signalisation de la famille B7-CD28. Co-stimulateur d'inhibition de l'activation des lymphocytes T (Keir et al. 2008).....	39
Figure 15: Comparaison de l'expression de PD-1, PD-1L, PD-2L et B7-1 sur différents types de cellules d'Homme ou de souris (Keir et al. 2008).....	41
Figure 16: Innervation des organes par le système nerveux sympathique entre les vertèbres thoraciques T1 à T12 et les vertèbres lombaires de L1 à L5 (Brommer et al. 2016).....	43
Figure 17: Pathophysiologie et signalisation du système nerveux sympathique suite à une lésion médullaire haute en position T3 ou T9, entraînant ou non une immunosuppression (SCI-IDS) (Brommer et al. 2016)	44
Figure 18: PD-1 et cancer. (Sznol and Chen 2013)	49
Figure 19: Observation par Image à Résonance Magnétique (IRM) du profil droit de souris Sham et SCI.	61
Figure 20: Survie des souris suite à une pneumonie à SASM.	63
Figure 21: Présence d'un œdème et d'une infiltration cellulaire pulmonaire suite à une pneumonie à SASM au 3^{ème} jour post-opératoire, dans des souris Sham et SCI	65
Figure 22: Charge bactérienne dans les poumons à 24h, 48h et 96h post-infection.....	66
Figure 23: État inflammatoire des poumons suite à une pneumonie induite à SASM au 3^{ème} jour post-opératoire, dans les souris Sham et SCI.....	67
Figure 24: Stratégie de gating des cellules dendritiques (DC) spléniques CD11c^{high}CMH-II⁺ par le logiciel Flow Jo.	69
Figure 25: Phase précoce hyper-inflammatoire suite à une lésion médullaire haute	70
Figure 26: Images de taille des rates en mm chez des souris Sham et SCI, 72h post-opératoires.....	71
Figure 27: Immunosuppression chez les souris SCI suite au traumatisme.....	72
Figure 28: Expression et production de la cytokine IL-10 dans les rates des souris Sham et SCI.	73
Figure 29: Diminution de production du TNF-α après stimulation par du LPS chez les souris SCI suite au traumatisme.	74
Figure 30: Expression de marqueurs membranaires de surface sur les cellules Natural Killer (NK) CD3⁻NKp46⁺ et les lymphocytes T (T-cells ou LT) CD3⁺NKp46⁻ spléniques, 16 heures post-opératoires dans les souris Sham et SCI.....	76

Figure 31: Immunosuppression chez les souris SCI suite à une pneumonie à SASM	78
Figure 32: Expression des molécules du CMH-II à la membrane des cellules dendritiques spléniques chez les souris SCI suite à une pneumonie à SASM.	79
Figure 33: Protocole d'immunothérapie par l'anticorps anti-PD-1.	81
Figure 34: Survie des souris SCI traitées par anticorps anti-PD1, ou par un anticorps isotype contrôle, suite à la pneumonie à SASM.....	82
Figure 35: Stratégie de gating des cellules lymphocytes T, des NKT et des cellules NK spléniques.	83
Figure 36 : Effet de l'immunothérapie anti-PD1 sur les cellules spléniques et sur l'épuisement lymphocytaire, 72 heures post-opératoires.	85
Figure 37: Pourcentage des populations spléniques de lymphocytes T (T-cells), NKT et NK chez les souris SCI traitées par l'anticorps anti-PD-1 ou par l'isotype contrôle, 72 heures post-opératoires.....	86
Figure 38: Coupe histologique de rates de souris Sham et SCI 48 heures post-opératoires.....	96
Figure 39: Nombre de cellules Caspase 3+ par champs analysé, dans les souris Sham et SCI 48 heures post-opératoires.	97

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Épidémiologie de lésion de la moelle épinière, données de la littérature (Wyndaele and Wyndaele 2006)	17
Tableau 2: Modèles animaux de lésion médullaire utilisés pendant les 10 dernières années (Zhang et al. 2014).....	42
Tableau 3: Comparaison des différentes méthodes pour effectuer une lésion médullaire (Zhang et al. 2014)	42
Tableau 4: Synthèse des principales caractéristiques d'une immunosuppression retrouvés chez les patients avec un traumatisme médullaire, de multi-traumatisme, un traumatisme crânien, une ischémie ou atteints d'un sepsis. (Mono : monocytes ; poly : polynucléaires).....	91
Tableau 5: Synthèse des principales caractéristiques d'une immunosuppression retrouvées dans des modèles de souris de traumatisme médullaire (SCI), mimant le scénario clinique.	92

TABLE DES ABRÉVIATIONS

A

A700, A488 : Alexa Fluor700, Alexa Fluor488

AIS : Abbreviated Injury Scale

APC : Allophycocyanin

α AR : Récepteur alpha-Adrénérique

β AR : Récepteur bêta-Adrénérique

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger

AVC : Accident Vasculaire Cérébrale

B

BCC : Bouillon Cœur-Cervelle

BSA : Bovin Serum Albumin

BV : Brilliant Violet

C

CARS : Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome

CD : Cluster of Differentiation

CMH-II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II

CNS : Système Nerveux Central

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

D

DAMP : Danger-Associated Molecular Patterns

DC : Cellules Dendritiques

E

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

F

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

G

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

α GalCer : α GalactosylCeramide

H

HLA : Human Leukocyte Antigen

I

IAS : Infection associée aux Soins
IFN- γ : Interféron-gamma
IL : Interleukine
ILCs : Cellules Lymphoïdes Innées
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IS : Immunosuppression
ISS : Injury Severity Score

K

KC : récepteurs Chimioattractants de Kératinocyte
KLRG1: Killer cell Lectin-like Receptor subfamily G member 1

L

LAG-3 : Lymphocyte-Activation Gene 3
LCMV ou **VCM** : Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocytes T
LTA : Acide Lipotéichoïque

M

McF : MacFarland
MPLA : MonoPhosphoryl Lipid A

N

NK : Natural Killer
NKp46 : Natural Killer cell p46-related protein
NKT : Lymphocytes T Natural Killer

P

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS : Phosphate Buffered Saline
PD-1 : Programmed cell Death receptor 1
PD-1L ou **PD-2L** : Programmed cell Death receptor 1 or 2 Ligand
PE : Phycoérythrine
PFA : Paraformaldehyde
PRR : Pattern Recognition Receptor

R

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

S

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
SCI : Spinal Cord Injury
SCI-IDS : Spinal Cord Injury- Immunodepression Syndrome
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome

SNC : Système Nerveux Central

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T _____

T3-T9 : vertèbres Thoraciques 3 à 9

TCR : T Cell Receptor

TLR : Toll-Like Receptor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha

U _____

UFC : Unité Formant Colonie

V _____

VAM : Ventilation Assistance Mécanique

VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

PRÉAMBULE

En unité de soins intensifs, les patients atteints d'un traumatisme sévère voient leur pronostic vital engagé en raison de leurs blessures mais également à cause du risque accru d'infection. Le traumatisme sévère entraîne une réponse systémique inflammatoire, suivi d'une immunosuppression (IS). Dans le cadre des traumatismes crâniens et rachidiens, le système nerveux central (SNC) est impliqué de manière majeure dans la mise en place de cette IS qui entraîne une vulnérabilité importante aux infections.

Après un traumatisme grave, dans 30 à 40% des cas, les patients vont contracter une infection associée aux soins (IAS) qui peut affecter leur pronostic vital et fonctionnel (Bronchard et al. 2004, Wesselkamper et al. 2008). Les pneumopathies sont les IAS les plus fréquentes en réanimation après un traumatisme grave. En Amérique du nord et en Europe, la bactérie principalement responsable de pneumonie chez les patients avec un traumatisme sévère est *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM). Le recours à une antibiothérapie systématique pour traiter ces infections bactériennes favorise l'émergence de bactéries résistantes. Pour pallier à cette problématique, de nouvelles thérapies ont été mises en place visant à stimuler le système immunitaire inné afin d'être plus efficace pour éliminer le pathogène et pour réguler la réponse inflammatoire pulmonaire. Des thérapies visant à activer le système immunitaire inné, première ligne de défense, existent déjà comme : l'IFN- γ , le GM-CSF (« *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* »), l'hydrocortisone et l'adjuvant monophosphoryl lipid A (MPLA). Néanmoins, il n'existe encore aucune thérapie chez l'Homme visant la stimulation du système immunitaire adaptatif en traumatologie. Depuis une dizaine d'années, l'immunothérapie par anticorps est étudiée en infectiologie et en cancérologie, et vise à stimuler le système immunitaire adaptatif. Pour le moment, seules des études sur des modèles de sepsis bactériens ou fongiques ont testé les effets de l'immunothérapie. Notre stratégie a été de tester cette nouvelle approche thérapeutique en prévention des infections dans un modèle murin de lésion médullaire.

Dans un premier temps, mon projet de doctorat a consisté à la mise en place et à la validation d'un modèle murin de traumatisme de lésion médullaire (SCI = Spinal Cord Injury), mimant un scénario clinique :

- Présence d'une paraplégie haute
- Sensibilité accrue à une infection pulmonaire à *Staphylococcus aureus*

- Présence à un temps précoce d'une réponse inflammatoire
- Présence à un temps plus tardif d'une IS

Dans un second temps, mon travail a consisté en la mise en place d'un traitement par immunothérapie par l'anticorps anti-PD-1 afin de tester son efficacité dans l'activation du système immunitaire adaptatif, dans un contexte d'IS et cibler contre les infections à SASM.

Introduction

INTRODUCTION

I- Traumatismes sévères

1- Traumatologie générale

1.1 Épidémiologie

En France, les traumatismes sévères représentent la première cause de mortalité chez les sujets de moins de 30 ans et constituent un problème majeur de santé publique. Dans la majorité des cas, les traumatismes sévères sont dus à des accidents de la circulation, des chutes, des brûlures ou à des actes de violence. La sévérité des lésions traumatiques est évaluée par deux scores anatomiques de sévérité des lésions : l'Abbreviated Injury Scale (A.I.S.) et l'Injury Severity Score (I.S.S.) (MacKenzie 1984 ; Hetherington and Earlam 1995). L'A.I.S. fournit un indice de sévérité compris entre 1 à 9, précisant si le traumatisme est mineur, modéré, critique ou mortel. L'I.S.S. donne un indice de sévérité codifié allant de 1 à 75 lorsqu'il y a un polytraumatisme. Il se calcule en faisant la somme des carrés des A.I.S. des trois régions corporelles les plus atteintes. Six territoires ont été définis : la tête / le cou, la face, le thorax, les organes internes de l'abdomen et du bassin, les extrémités / la ceinture pelvienne, et les parties molles externes (correspondantes à toute surface corporelle).

Les patients avec des traumatismes sévères, définis par un ISS>15, qui ne décèdent pas suite à leurs blessures présentent un syndrome inflammatoire qui peut être exacerbé et qui est suivi d'une immunosuppression (IS) rendant les patients particulièrement vulnérables aux infections. Plusieurs études montrent qu'il existe des facteurs de risque spécifiques d'infection chez les patients traumatisés : une lésion médullaire, l'intubation et la ventilation assistée, les procédures multiples de chirurgie, l'insertion de cathéter veineux et la transfusion sanguine (Morgan 1992; Papia et al. 1999). Ces facteurs de risque d'infections sont dits « associés aux soins » (IAS). Près des deux-tiers des infections post-traumatiques précoces sont représentées par les pneumopathies suivies par les infections urinaires et les infections du site opératoire.

2- La lésion médullaire haute (SCI : « Spinal Cord Injury »)

2.1 Épidémiologie

D'après l'organisation mondiale de la santé, entre 250 000 et 500 000 personnes souffrent de lésions de la moelle épinière dans le monde (<http://www.who.int>). Une étude effectuée en 2000 en France montre 934 nouveaux cas par an (Albert and Ravaud 2005). Les individus majoritairement touchés sont les hommes jeunes de moins de 30 ans (**Tableau 1**).

Tableau 1: Épidémiologie de lésion de la moelle épinière, données de la littérature (Wyndaele and Wyndaele 2006)

	Paraplegia (%)	Tetraplegia (%)	Complete (%)	Incomplete (%)	Age (years)	Men/women
Kurtzke ⁵	86.40	13.60	40.00	60.00	15–34	5.0/1
Tricot ⁶	42.68–91.3	8.7–57.32			38.2	4.6/1
van Asbeck <i>et al</i> ¹⁸	43.00	57.00	48.70	51.30		3.0/1
Maharaj ¹³	69.00	31.00	52.10	47.90	16–30: 35%	4.0/1
Dahlberg <i>et al</i> ⁸	54.00	46.00	43.00	57.00	31.00	3.0/1
Karacan <i>et al</i> ¹⁹	67.80	32.18			35.5±15.1	2.5/1
Karamehmetoglu <i>et al</i> ⁹	67.00	33.00			33.00	3.0/1
Karamehmetoglu <i>et al</i> ¹⁶	58.70	41.30			31.3	5.8/1
Chen <i>et al</i> ¹⁴					46.1	3.0/1
Martins <i>et al</i> ¹⁷					50.00	3.0/1
Surkin <i>et al</i> ²⁰						4.4/1

Les accidents de la voie publique et les chutes représentent respectivement 35% et 33% des traumatismes médullaires sévères (Lonjon et al. 2012). Les symptômes dépendent de la gravité de la lésion et de sa localisation médullaire. Les principales causes de complications secondaires à la phase aiguë sont les complications du système respiratoire au sens large (van den Berg et al. 2010 ; Sezer, Akkuş, and Uğurlu 2015) et les infections (Montgomerie 1997).

Les patients souffrant de lésions médullaires ont souvent des durées d'hospitalisation longues, ce qui augmente le risque d'IAS (LaVela et al. 2007). Le recours aux antibiotiques favorise également l'émergence de bactéries multi-résistantes ce qui représente une charge importante en soins et un cout élevé pour la communauté (Montgomerie 1997). Les IAS les plus retrouvées chez ces patients se situent au niveau respiratoire (36.4%) et au niveau du tractus urinaire (32.2%) (Lalwani et al. 2014). L'inhalation avant intubation et la ventilation

mécanique (VAM) sont des facteurs de risque pour l'apparition précoce de pneumonie. *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM) est l'agent pathogène le plus fréquent dans les pneumonies chez les patients polytraumatisés (Rello et al. 1992), ou avec un traumatisme crânien (Bronchard et al. 2004 ; Asehnoune et al. 2014), ou chez les patients brûlés (Siah et al. 2009), en Europe (Boque, Bodi, and Rello 2000).

2.2 La Synapse : Système nerveux central (SNC)/Système immunitaire

Le système nerveux central interagit avec le système immunitaire par les systèmes nerveux sympathique et parasympathique (nerf vague) (**Figure 1**). Les fibres nerveuses du système sympathique innervent plusieurs organes lymphoïdes comme le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques, le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT) et la moelle osseuse (Felten et al. 1985 ; Cano et al. 2001). Il a été démontré que la rate est innervée par des neurones sympathiques pré-ganglionnaires situés dans la région T1-T12 des vertèbres thoraciques (Cano et al. 2001).

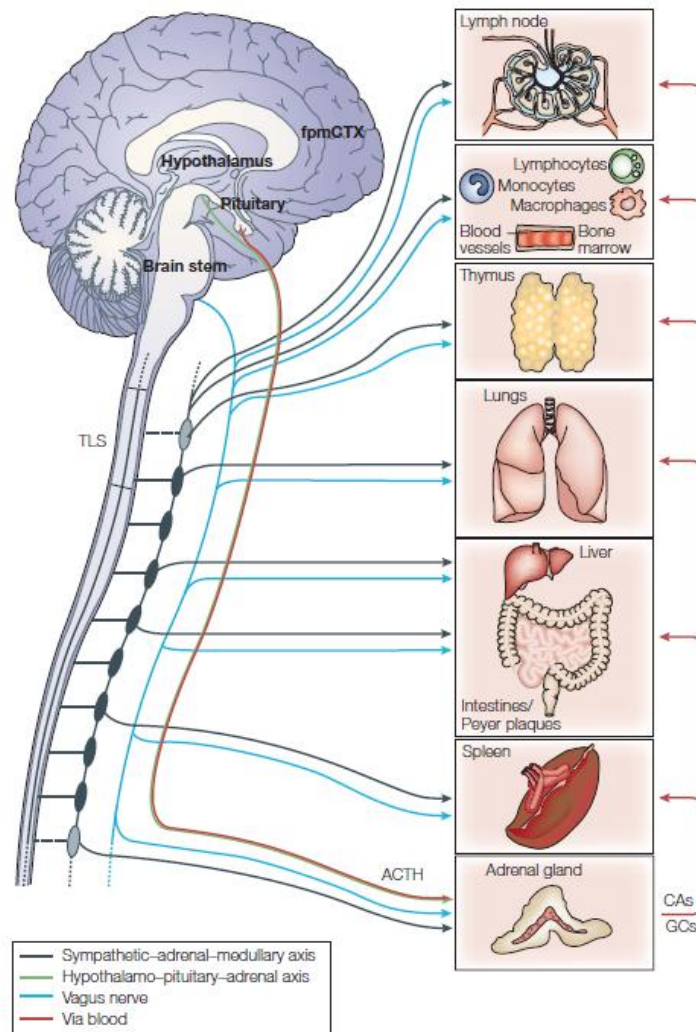


Figure 1 : Communication bidirectionnelle des systèmes nerveux et immunitaire. fpmCTX : cortex premoteur frontal ; TLS : Système Thoracique-Lombaire ; ACTH : hormone adrenocorticotropics ; CAs : catecholamines ; GCs : hormones glucocorticoïdes (Meisel et al. 2005)

L'activation du système nerveux sympathique entraîne une libération des catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine) du nerf sympathique terminal et de la médullosurrénale. Dans les années 80, il y a eu une première description du rôle des catécholamines et de l'innervation du thymus et de la rate chez la souris (Felten et al. 1985). Des fibres noradrénergiques sont présentes dans les organes lymphoïdes (thymus et rate) et sont associées au système vasculaire. Felten et collaborateurs. ont montré que les fibres noradrénergiques étaient immédiatement adjacentes aux lymphocytes, par exemple au niveau de la pulpe blanche dans la rate (Felten et al. 1985).

Suite à un traumatisme médullaire (SCI) ou à un traumatisme crânien, le système nerveux sympathique va être fortement activé et les catécholamines comme l'adrénaline vont être libérées dans le sang, contribuant alors au syndrome d'immunodéficience (SCI-IDS) (**Figure 2**).

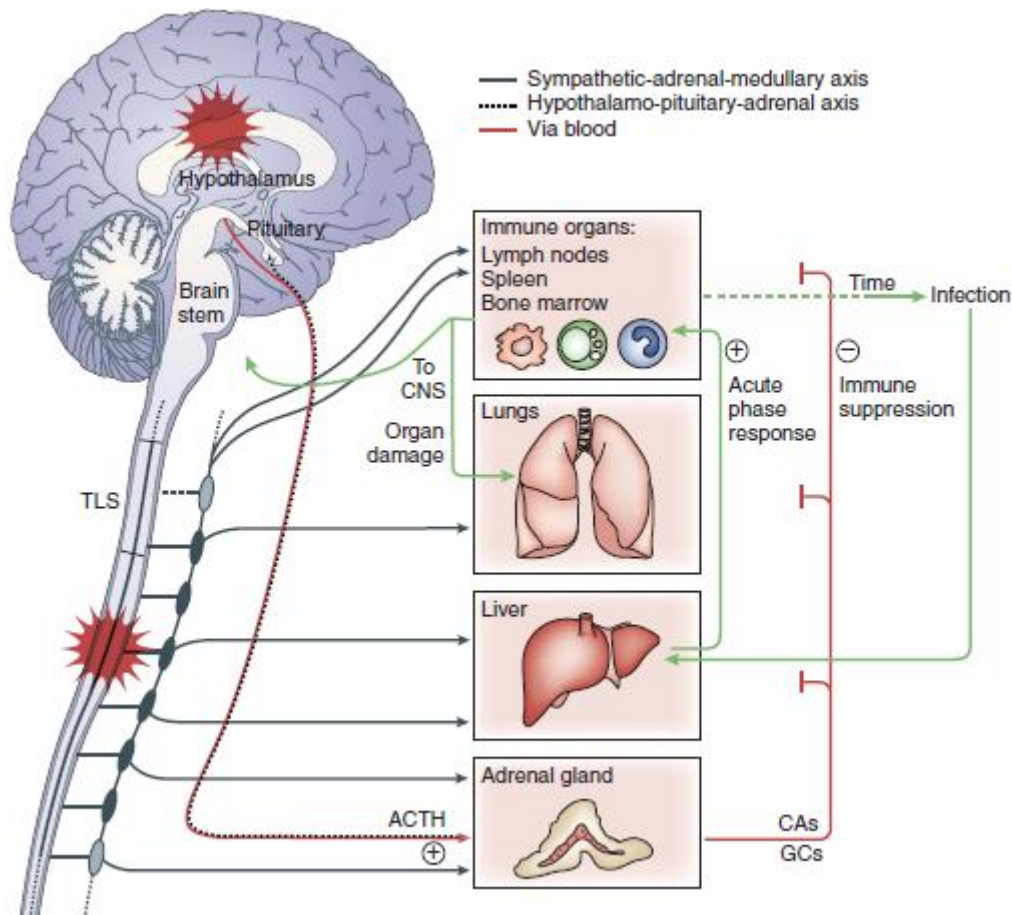


Figure 2 : Une lésion au niveau du cerveau ou de la moelle épinière entraîne une suppression de la fonction immunitaire tout en activant une cascade inflammatoire. L'activation des axes Hypothalamiques et surreno-sympathique-médullaire libère des catécholamines (CA) et des glucocorticoïdes (GC) qui contribuent au syndrome d'immunodéficience suite à une lésion médullaire (SCI-IDS). L'activation simultanée d'une réponse de phase aiguë hépatique proinflammatoire contribue aux dommages des organes et à la neuro-inflammation. ACTH, hormone adrénocorticotrope; TLS, moelle épinière Thoracique-lombaire (Popovich and McTigue 2009)

Les catécholamines interagissent avec les organes par les récepteurs adrénergiques. Ces récepteurs comportent 7 domaines transmembranaires qui sont couplés aux protéines G. Ils sont classifiés en 3 types majeurs : les récepteurs alpha-adrénergiques (α AR) α_1 et α_2 et les récepteurs bêta-adrénergiques (β AR), qui sont chacun divisés en 3 sous-types. Ils sont largement exprimés dans le SNC et tous les tissus périphériques (Bylund et al. 1994). La présence de récepteurs adrénergiques sur la plupart des leucocytes indique que le système

immunitaire est fortement influencé par le niveau d'activité du système sympathique. Le sous-type β_2 AR est le récepteur exprimé sur de nombreuses cellules immunes comme les cellules dendritiques, les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, les cellules Natural Killer (NK), et les lymphocytes B chez les rongeurs et chez l'Homme (Sanders and Straub 2002 ; Kin and Sanders 2006 ; Nance and Sanders 2007). Les récepteurs β_2 AR sont aussi présents au niveau des cellules musculaires lisses (voies respiratoires, vaisseaux sanguins, tractus digestif et urogénital), où leur activation se traduit par une relaxation musculaire. Les catécholamines, via les récepteurs β_2 AR, augmentent la proportion de cellules NK, diminuent les lymphocytes T $CD4^+$ (Schedlowski et al. 1996 ; Kimura et al. 2005), et modulent leurs fonctions comme par exemple la suppression de la cytotoxicité des cellules NK (Irwin et al. 1990). L'adrénaline, nommée aussi épinéphrine, inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires TNF- α et d'IL-6, et potentialise la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (van der Poll et al. 1994 ; van der Poll et al. 1996). Ce phénomène d'activation du système nerveux sympathique entraîne une importante production d'IL-10 qui joue un rôle clé dans la mise en place de l'IS suite à un traumatisme sévère notamment crânien (Woiciechowsky et al. 1998).

Une lésion aiguë du SNC induit une perturbation de son interaction avec le système immunitaire. En induisant la libération locale de modulateurs immunitaires, tels que les interleukines, une lésion du SNC active l'hypothalamus, l'axe hypophyso-surrénalien et les systèmes nerveux sympathique et parasympathique. La libération de l'adrénaline, des glucocorticoïdes et de l'acétylcholine entraîne une réponse anti-inflammatoire systémique, par exemple : expression de l'IL-10 par les macrophages, diminution de production de la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ par les lymphocytes Th1, ou diminution de la cytotoxicité des cellules NK. En conséquence une IS se met en place, entraînant la rupture des barrières immunologiques et le développement d'infections opportunistes (**Figure 3**).

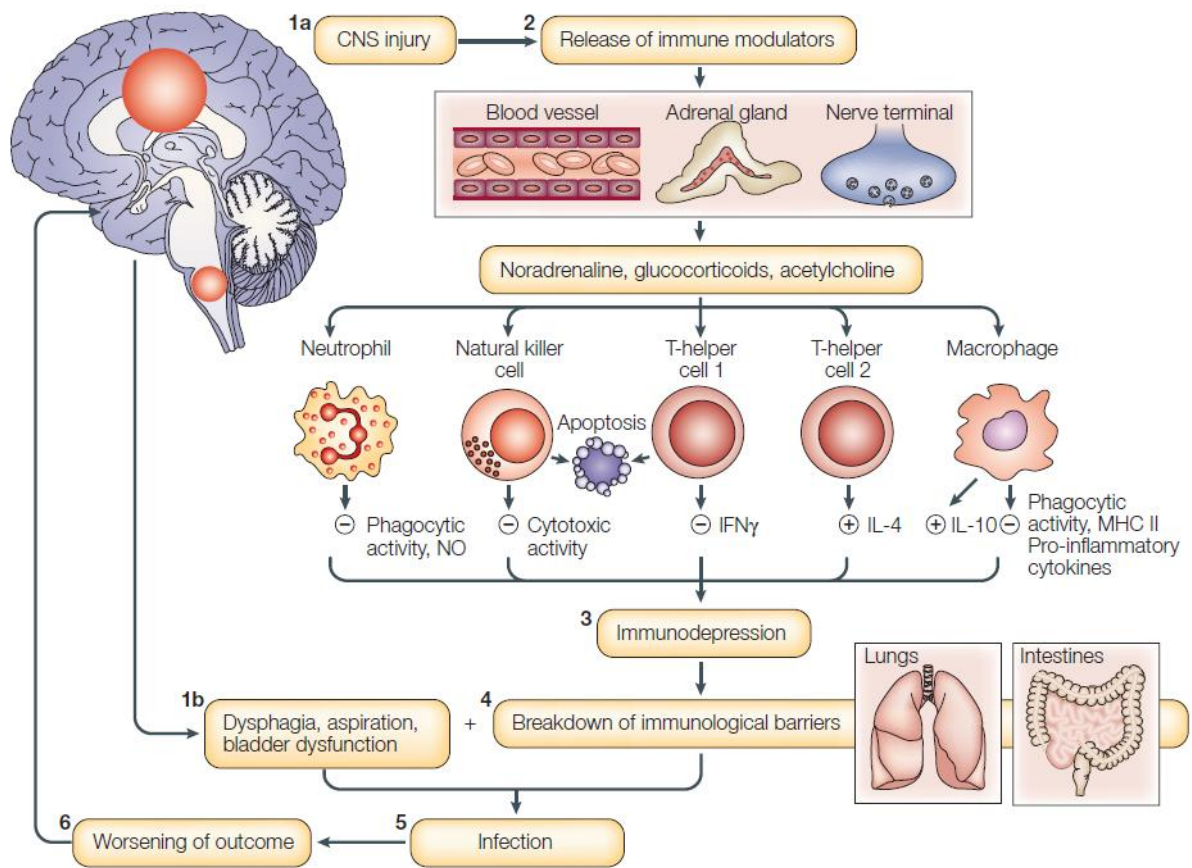


Figure 3 : Schéma résumant les évènements physiopathologiques qui mènent de la lésion du système nerveux central (CNS) à l'infection, suite à un traumatisme sévère (Meisel et al. 2005)

II- Immunosuppression induite par un stress aigu

1- Réponse immunitaire induite par un stress

1.1 SIRS-CARS syndrome

Suite à un traumatisme grave, des fonctionnalités importantes du système immunitaire sont modifiées. Tout d'abord, on observe une première réponse immunitaire pro-inflammatoire avec un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), puis une seconde réponse immunitaire anti-inflammatoire systémique compensatrice (CARS) (**Figure 4**).

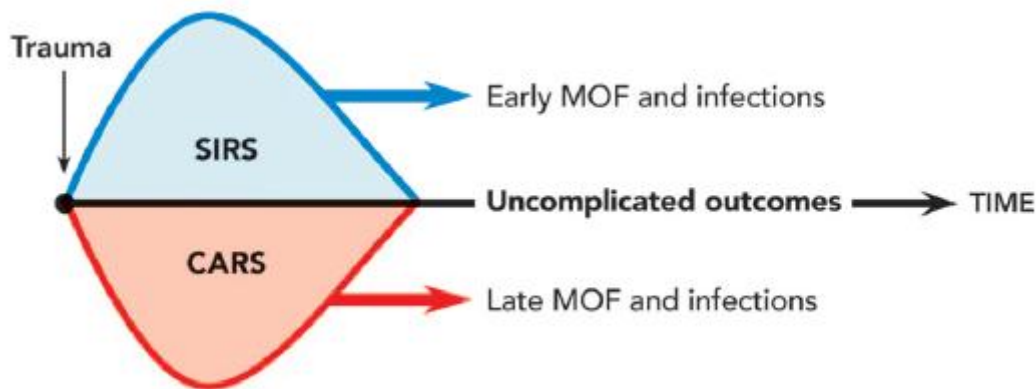


Figure 4 : Un traumatisme sévère induit une activation de la réponse immunitaire innée par la production de cytokines pro et anti-inflammatoires. CARS (compensatory anti-inflammatory Response), MOF (multiple organ failure), SIRS (systemic inflammatory response syndrome), (Asehnoune, Roquilly, and Abraham 2012).

La réponse CARS correspond à la phase d'IS, qui est nécessaire suite à la réponse hyper-inflammatoire afin d'assurer l'homéostasie immunitaire et la cicatrisation des lésions (Hotchkiss et al. 2009; Asehnoune, Roquilly, and Abraham 2012). Durant la phase d'IS, quand celle-ci perdure, on observe une sensibilité plus importante aux infections (comme par exemple : une réactivation virale) (**Figure 5**) (Boomer, Green, and Hotchkiss 2014).

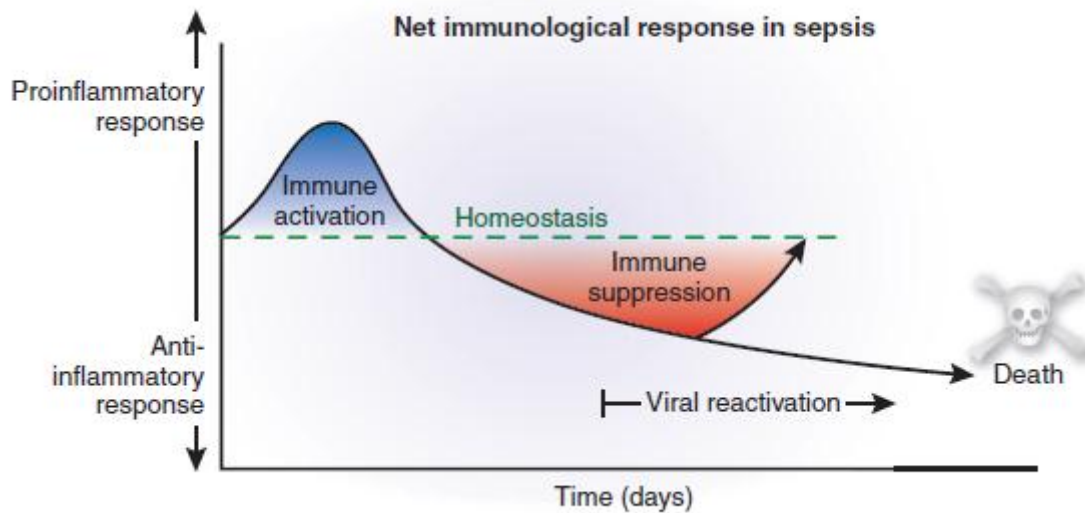


Figure 5: Réponse immunologique pendant un sepsis, avec une réponse pro-inflammatoire prédominante au début, puis tardivement une réponse anti-inflammatoire prédomine (Hotchkiss et al. 2009)

Les pneumonies, première cause d'infection liée à l'IS, élèvent la mortalité et augmentent la durée d'hospitalisation des patients traumatisés (Papia et al. 1999 ; Aguiar Júnior, Saleh, and Whitaker 2016). Cependant, les mécanismes physiopathologiques de l'IS systémique restent mal connus.

2- L'immunité innée et adaptative dans l'immunosuppression

2.1 Définition générale de l'immunosuppression

L'IS correspond à l'inhibition de la réponse immunitaire afin d'empêcher un emballement de celle-ci. Cette IS est naturellement présente suite à une réponse hyper-inflammatoire, afin que l'organisme retrouve progressivement un état d'homéostasie. L'IS peut également être le résultat de l'action de cellules cancéreuses (qui induisent un microenvironnement immunosuppresseur leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire), ou d'infections chroniques comme le virus d'immunodéficience humaine (VIH) (Lederman et al. 2013). L'IS peut être enfin induite médicalement, on peut citer l'utilisation d'immunosuppresseurs pour empêcher un rejet d'organe lors d'une greffe.

L'IS peut être mise en place suite à l'inhibition d'un signal impliqué dans l'interaction des cellules présentatrices d'antigène (comme les cellules dendritiques) avec les lymphocytes T. Pour activer les lymphocytes T par cette interaction cellulaire, trois signaux de costimulation sont nécessaires (**Figure 6**) : le premier signal correspond à l'interaction entre CMH/TCR ; le second entre CD80/CD86 et CD28 de la famille B7-CD28 (Ledbetter et al. 1990 ; Lenschow, Walunas, and Bluestone 1996) ; et le troisième signal est l'activation par les cytokines inflammatoires (Curtsinger and Mescher 2010).

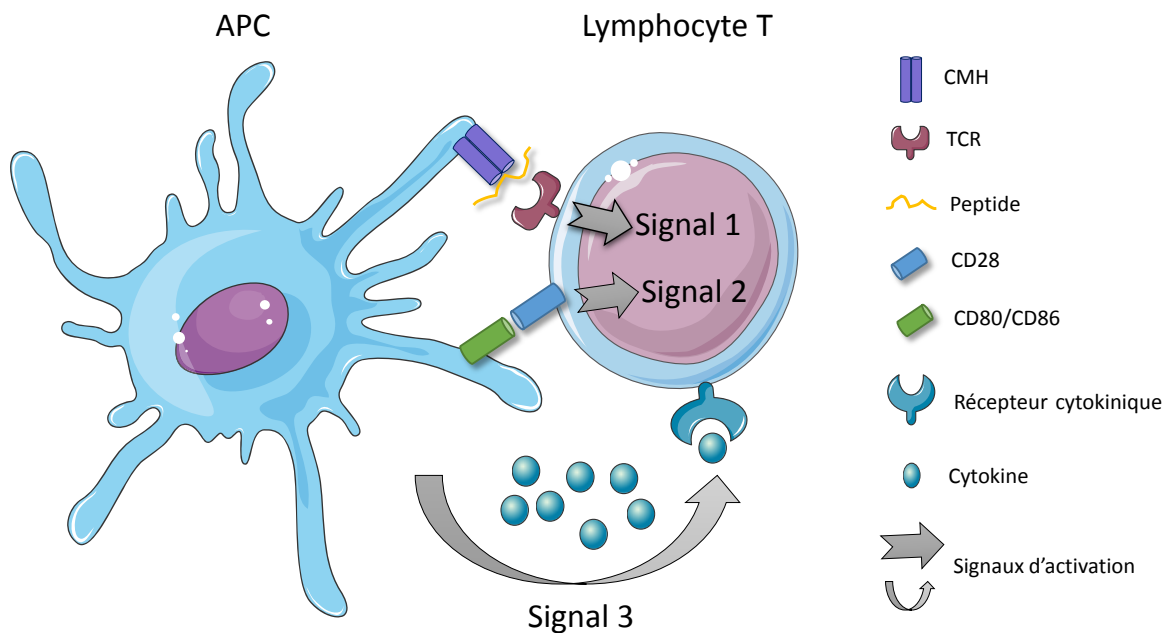


Figure 6: Activation des lymphocytes T par les trois signaux de co-stimulation suite à l'interaction avec les cellules présentatrices d'antigène (APC). Signal 1 activé suite à l'interaction entre le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) contenant un fragment de peptide et le récepteur T-cell (TCR) sur les lymphocytes Ts. Signal 2 activé suite à l'interaction entre les molécules co-stimultrices (CD80/CD86) sur la surface des APC avec ses ligands (comme CD28) sur la surface membranaire des lymphocytes T. Signal 3 activé suite à la sécrétion de cytokines par les APC qui interagissent avec leur récepteur sur les lymphocytes T.

La réponse immunitaire peut être inhibée par une réponse anti-inflammatoire (production d'IL-10 par exemple), mais aussi par la baisse de production des cytokines inflammatoires comme le TNF- α et l'IFN- γ . Nous discuterons par la suite des modifications impliquées dans ces trois signaux (**Figure 6**) suite à une lésion médullaire, permettant la mise en place de l'IS.

2.2 Les altérations de la réponse immunitaire innée durant l'immunosuppression consécutives à un traumatisme sévère

L'immunité innée est la première ligne de défense, et l'évolution témoigne de son efficacité par sa présence dans l'ensemble des êtres vivants invertébrés et vertébrés. Les cellules de l'immunité innée tels que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles), les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont susceptibles d'entrer en contact direct avec les micro-organismes. Ces cellules ont développé des mécanismes de reconnaissance de motifs antigéniques des micro-organismes, ainsi que des mécanismes qui permettent de différencier les cellules du « soi » et du « non-soi ». Au sein de l'immunité innée, les monocytes-macrophages et les cellules dendritiques notamment peuvent phagocyter les pathogènes. Cette activité de phagocytose permet un déversement dans le milieu extracellulaire de médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines ou les chimiokines. Pour exemple, la chimiokine KC (Keratinocyte chemoattractant) va attirer les neutrophiles sur le lieu de l'infection et ceux-ci vont contribuer à l'inflammation locale et à l'élimination des pathogènes.

2.2.1 Tolérance au LPS

Les cellules du système de l'immunité innée ont des récepteurs de type PRR (Pattern Recognition Receptor) qui reconnaissent les PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern), motifs conservés et exprimés par les pathogènes comme, par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatifs, ou les acides lipotéichoïques (LTA) des bactéries Gram positifs. Cette interaction entre les PRR et les PAMP déclenche alors l'activation des cellules immunitaires, qui vont produire des molécules inflammatoires comme les chimiokines et les cytokines pro-inflammatoires : TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-12, IL-15 ou des cytokines anti-inflammatoires : IL-4, IL-10, IL-13 (Medzhitov and Janeway 2000 ; Newton and Dixit 2012). Ils orientent aussi la réponse adaptative vers une composante inflammatoire (Th1) ou anti-inflammatoire (Th2). Il existe plusieurs sortes de PRRs, dont la famille TLR (Toll Like Receptor) (O'Neill, Golenbock, and Bowie 2013). Les TLRs peuvent être exprimés à la

membrane cellulaire ou en intracellulaire. Ils possèdent chacun des motifs de reconnaissance qui leur sont propres, par exemple le TLR-4 reconnaît le LPS des bactéries (**Figure 7**), ou encore le TLR-2 reconnaît le LTA.

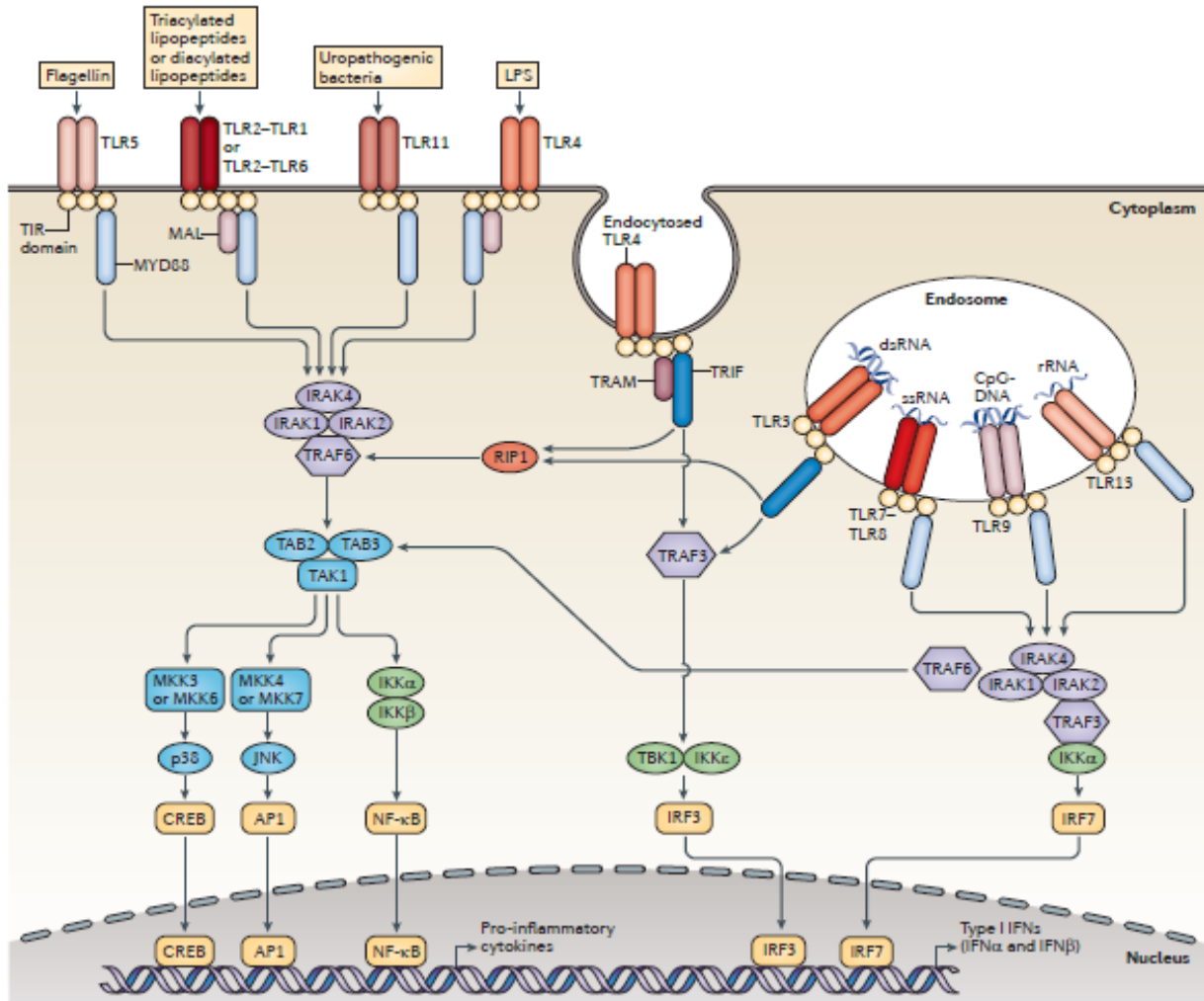


Figure 7: Voie de signalisation des TLRs des mammifères (O'Neill, Golenbock, and Bowie 2013)

Dans des conditions de stress aigu, l'hyporéactivité des cellules sanguines au LPS, traduite par la diminution des capacités de production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α) est un indicateur d'IS (Asehnoune et al, 2006). Ce phénomène est retrouvé dans des modèles animaux de traumatisme sévère tel que le modèle de choc hémorragique (Roquilly et al. 2010) mais également chez des patients ayant subi un traumatisme sévère ou atteints de sepsis (Ertel et al. 1995 ; Boomer et al. 2011).

2.2.2 Le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II ou HLA)

Le système HLA de classe II contient des gènes classiques (DP, DR, DQ) qui codent pour des protéines retrouvées principalement à la surface des cellules présentatrices d'antigène comme : les monocytes, les macrophages, les DC, les lymphocytes B, les lymphocytes T activés et les cellules activées de l'endothélium vasculaire. Le système moléculaire DR est majoritairement représenté. Les cellules dendritiques expriment de façon constitutive les molécules HLA-DR à leur surface, ainsi que tous les monocytes du sang circulant. Son expression peut être modulée par différentes molécules immunomodulatrices : l'IFN- γ (Armendariz-Borunda et al. 1996) et le GM-CSF qui la stimulent, tandis que l'IL-10 la réprime (Fumeaux and Pugin 2002).

La réponse protectrice face à une inflammation systémique consécutive à une agression aiguë est une diminution de l'expression membranaire de HLA-DR sur les monocytes (Kim et al. 2010). Chez les patients traumatisés sévères, une diminution de l'expression de HLA-DR est fréquemment observée, et elle est la principale caractéristique de la présence d'une IS (Riegger et al. 2009; Boomer et al. 2011). La diminution d'expression d'HLA-DR ne devient pathologique que si elle perdure.

2.2.3 Les Cellules Lymphoïdes Innées (ILCs)

Parmi les cellules de l'immunité innée, les Cellules Lymphoïdes Innées (ILCs), dont les cellules NK (Natural Killer) et les cellules NKT (Natural Killer T), jouent un rôle crucial au cours d'une infection, d'une lésion tissulaire, ou d'une inflammation, et contribuent à l'activation du système immunitaire adaptatif (Gasteiger and Rudensky 2014 ; Klose and Artis 2016).

Les ILCs sont des cellules lymphoïdes qui appartiennent à l'immunité innée (Rankin et al. 2013). Les ILCs ont plusieurs rôles, elles participent : à la réponse immunitaire contre les agents infectieux pathogènes, à l'inflammation, au contrôle des agents microbiens commensaux, à la protection de la barrière épithéliale, au remodelage tissulaire et à la

régulation de l'homéostasie des cellules stromales tissulaires (Yazdani et al. 2015). Une particularité importante des ILCs est leur capacité de production de cytokines effectrices (IFN- γ , IL-5/IL-13 et IL-17/IL-22), en réponse à un signal de danger, de manière beaucoup plus rapide que les lymphocytes de l'immunité adaptative. Les ILCs sont différenciées en trois groupes basés sur leurs caractéristiques fonctionnelles : ILC1, ILC2 et ILC3 (**Figure 8**) Les ILCs sont définies par trois caractéristiques : l'absence de gènes d'activation de recombinaison (RAG) dépendante du réarrangement de récepteur d'antigène, l'absence d'expression des marqueurs phénotypiques des cellules myéloïdes et dendritiques, et une morphologie de type lymphoïde (Cella et al. 2009 ; Takatori et al. 2009). Les ILCs pourraient jouer un rôle essentiel dans la mise en place de l'IS mais peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature.

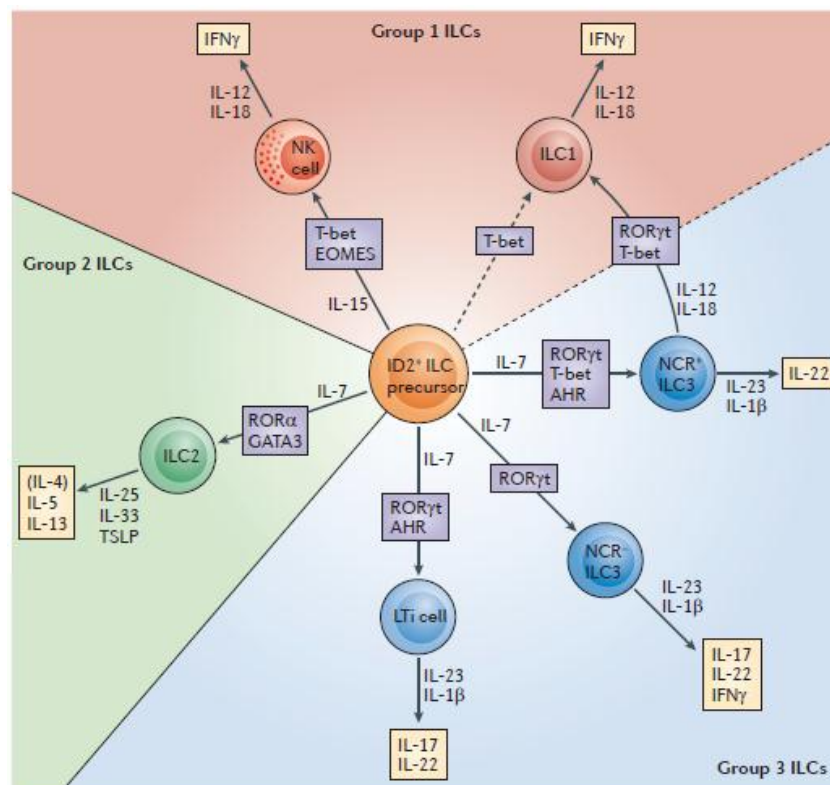


Figure 8: Classification des ILCs en 3 groupes basée sur leurs caractéristiques fonctionnelles (Spits et al. 2013)

2.2.3.1 Les cellules Natural Killer (NK)

Les cellules NK sont des lymphocytes qui n'expriment pas le marqueur CD3 des lymphocytes T, mais qui expriment CD56 (Cooper, Fehniger, and Caligiuri 2001). Ces cellules contiennent des granules cytoplasmiques contenant des lysozymes. Lors de leur activation, les cellules NK sont capables de reconnaître les cellules infectées et d'induire leur apoptose par dégranulation. Ces cellules ont aussi une fonction cytolytique (Koch et al. 2013). L'activation des cellules NK passe par un équilibre subtil entre la stimulation des récepteurs activateurs et inhibiteurs (Long et al. 2013). Les cellules NK peuvent donc avoir une fonction cytotoxique et une fonction immunorégulatrice (**Figure 9**) du fait de la production de cytokines qui vont orienter l'immunité vers une réponse immunitaire pro-inflammatoire (l'IFN- γ) ou anti-inflammatoire (IL-10).

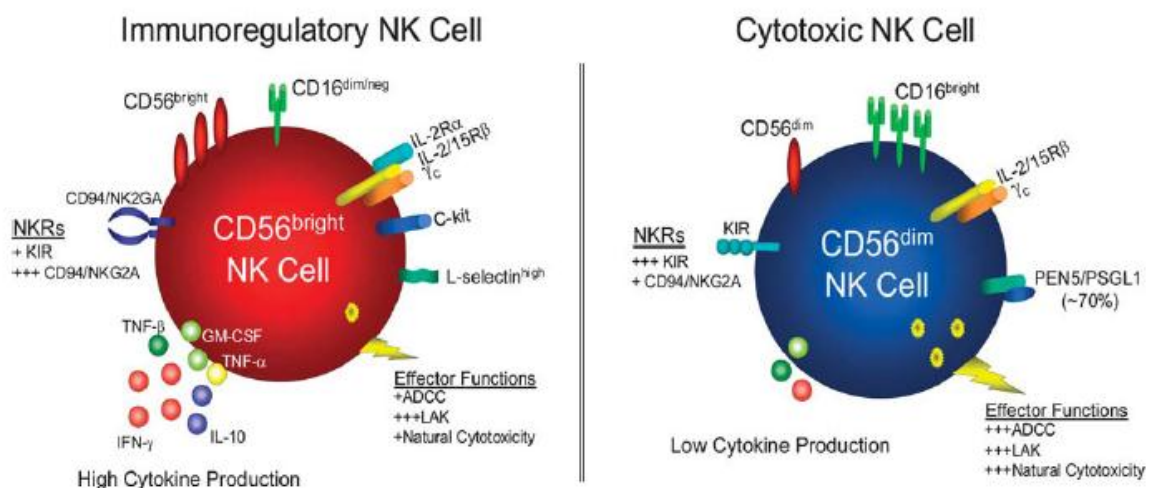


Figure 9: *Sous-types de cellules NK humaines. Les cellules NK CD56^{bright} sont principalement des cellules immunorégulatrices qui produisent des cytokines après stimulation. Ce sous-groupe a une faible expression de CD16 et une faible cytotoxicité naturelle. Les cellules NK CD56^{dim} sont essentiellement des cellules cytotoxiques qui produisent de faibles taux de cytokines (Farag and Caligiuri 2006).*

Des études montrent que chez les patients atteints de sepsis, les cellules NK jouent un rôle primordial lors du syndrome hyper-inflammatoire (SIRS) (Chiche et al. 2011), car ils sont la source principale de production de la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ . Récemment, il a été montré que les cellules NK avait besoin d'une stimulation par IL-12 lors d'une infection par *Pseudomonas aeruginosa* pour produire de grande quantité d'IFN- γ (Vourc'h et al. 2017). Il existe une étroite interaction (« cross-talk ») entre les cellules NK et les cellules dendritiques (Walzer et al. 2005). Les cellules dendritiques activent les cellules NK par la sécrétion d'IL-12, IL-15, IL-18 ou IL-21, ce qui va stimuler la production d'IFN- γ par les cellules NK (Hazlett et al. 2002 ; Strengell et al. 2003). Dans le cas d'une infection systémique, la surproduction d'IL-12 va être inhibée par un rétrocontrôle négatif par la cytokine anti-inflammatoire IL-10, qui va alors inhiber l'activation des cellules dendritiques et favoriser un état d'IS (**Figure 10**). Dans le cas d'une infection locale, la production d'IL-12 active les cellules NK et leurs fonctions régulatrices pro-inflammatoires par la production d'IFN- γ .

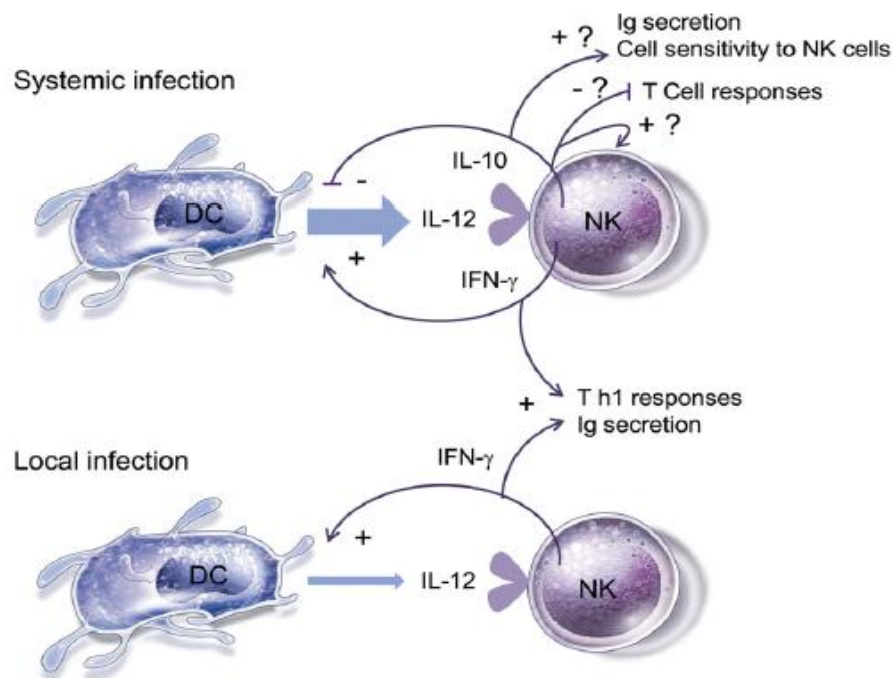


Figure 10: Interaction entre les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes Natural Killer (NK), dans le cas d'une infection systémique ou locale (Vivier and Ugolini 2009)

2.2.3.2 Les lymphocytes NKT

Les cellules NKT sont des lymphocytes T qui co-expriment le récepteur des lymphocytes T TCR- $\alpha\beta$ et des récepteurs caractéristiques des lymphocytes NK tels que NK1.1 chez la souris et CD161 chez l'Homme (**Figure 11**). Ces lymphocytes T non conventionnels possédant un TCR semi-invariant ne sont pas capables de reconnaître le complexe peptide-CMH, mais seulement et spécifiquement des lipides et glycolipides présentés par la molécule CD1d (Borg et al. 2007) comme l' α -galactosylceramide (α GalCer : glycolipide d'éponge marine), le galacturonosylceramide et le glucuronosylceramide (exprimés respectivement par les bactéries gram négative *Ehrlichia muris* et *Sphingomonas*) (Brutkiewicz 2006), et l' α -galactosyl diacylglycerol (*Borrelia Burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme) (Kinjo et al. 2006).

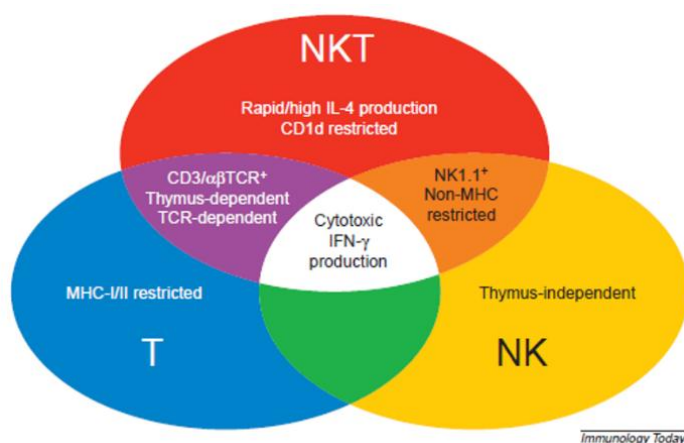


Figure 11: Les cellules NKT de souris partagent certaines caractéristiques avec les cellules NK et T. Les caractéristiques qui sont uniques pour chaque lignée sont présentées dans les sections qui ne se chevauchent pas. Les caractéristiques communes à deux de ces lignées sont indiquées dans les zones de chevauchement concernées (violette, orange ou vert). La zone centrale (blanche) indique des caractéristiques qui peuvent être exposées par les trois lignées. MHC, molécule du complexe majeure d'histocompatibilité ; NK, Natural Killer; NKT, cellules T NK1.1; TCR, récepteur de cellules T (Godfrey et al. 2000).

Il existe 3 types de cellules NKT : les cellules NKT de type I invariantes (iNKT), NKT de type II variantes (vNKT) et les NKT de type III les NKT-like (Godfrey, Stankovic, and Baxter 2010 et Godfrey et al. 2015).

- Les iNKT portent une chaîne α du TCR invariante (V α 14J α 18 chez la souris et

V α 24J α 18 chez l'Homme) sélectionnée positivement par les molécules CD1d.

- Les vNKT sont sélectionnées par les molécules CD1d sont CD4⁺ ou CD4⁻CD8⁻, mais possèdent un TCR plus hétérogène que celui des cellules iNKT, constitué des chaînes V α 3.2J α 9V β 8 ou V α 8/V β 38.
- Les NKT-like sont indépendantes du CD1d, présentent un TCR diversifié et peuvent être CD4⁺, CD8⁺ ou CD4⁻CD8⁻. Chez l'homme, la majorité des cellules CD3⁺CD56⁺ font partie de ce groupe.

Les cellules NKT se développent dans le thymus comme les lymphocytes T conventionnels. Chez la souris, les iNKT matures représentent environ 0,5 à 1% des lymphocytes T circulants, 2,5% des splénocytes T et environ 20% des lymphocytes T hépatiques (Bendelac, Savage, and Teyton 2007). Chez l'homme, les taux circulants d'iNKT sont très variables d'un individu à l'autre, et représentent 0,1% des lymphocytes T circulants. Contrairement à la souris, l'organe le plus riche en iNKT chez l'homme est l'épiploon (jusqu'à 10% des lymphocytes T) (Rubio 2013).

Les cellules NKT modulent la réponse immunitaire en produisant rapidement de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires comme : l'IFN- γ , l'IL-2 mais aussi du TNF- α , et du GM-CSF, permettant d'initier la réponse inflammatoire. Elles peuvent aussi produire de grande quantité de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- β (Liao, Zimmer, and Wang 2013). Ce sont des cellules situées à l'intersection entre la réponse immunitaire innée et adaptative (**Figure 12**).

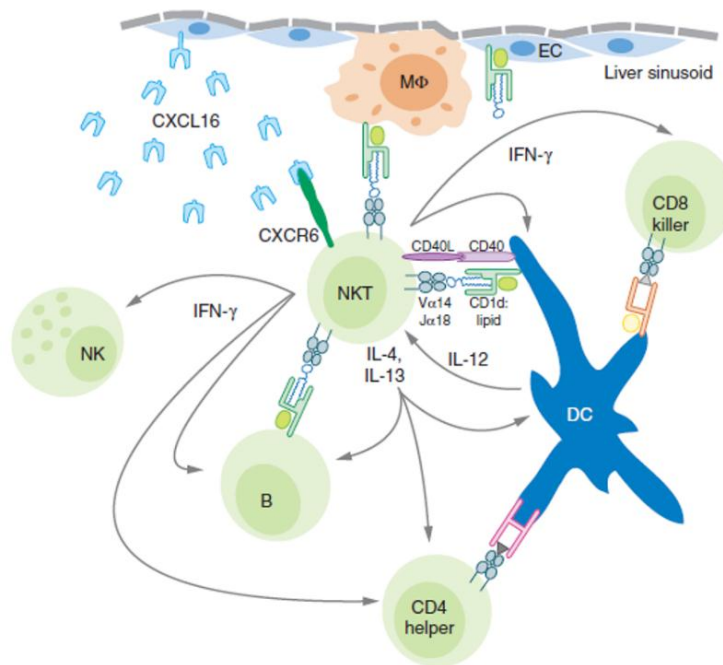


Figure 12: Réseau d'interaction moléculaire et cellulaire des cellules NKT dans la réponse immunitaire (Bendelac, Savage, and Teyton 2007)

Plusieurs travaux sur des modèles de sepsis utilisant des souches de souris déficientes en CD1d (Dieli et al. 2000), ou traités par des anticorps anti-CD1d (Nagarajan and Kronenberg 2007), ont montré la contribution majeure des cellules NKT dans la phase d'IS, notamment dans le contexte d'un accident vasculaire cérébral (Wong et al. 2011). Dans l'étude de Wong et collaborateurs., les auteurs ont observé que le phénotype des NKT pouvait basculer entre la production d'IFN- γ et d'IL-10. Les cellules iNKT produisent plus de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) suite à un accident vasculaire cérébral ischémique, alors que leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires diminuait (IFN- γ et IL-12p70).

Le blocage de la voie des catécholamines par le propranol (un bêta-bloquant non sélectif) dans un modèle murin d'accident vasculaire cérébral, entraîne une augmentation de la production d'IFN- γ et la clairance de l'infection bactérienne, de manière similaire que le traitement α GalCer. L'effet du propranol est entièrement dépendants des iNKT, car chez les souris déficientes en iNKT (CD1d^{-/-}) il n'y a pas de protection contre l'infection ou la mortalité (Wong et al. 2011). Ces résultats ont clairement mis en évidence l'implication des catécholamines et des cellules iNKT dans l'apparition de l'IS.

Les deux types cellulaires NK et NKT peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. Or, après un traumatisme sévère, l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ diminue, alors que l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 augmente ; cette balance est en faveur d'une réponse de type immunosuppressive (Chamorro, Urra, and Planas 2007; Muenzer et al. 2010; Roquilly et al. 2013). Ces cellules semblent jouer un rôle clé dans la mise en place d'une IS.

2.3 Les altérations de la réponse immunitaire adaptative durant l'immunosuppression suite à un traumatisme sévère

Précédemment, nous avons vu que les cellules du système immunitaire inné produisaient moins de cytokines pro-inflammatoires, et exprimaient moins de molécules du CMH-II définissant ainsi l'IS. Ces molécules sont des signaux clés nécessaires à l'activation des lymphocytes lors de l'interaction entre cellules dendritiques et lymphocytes. Les signaux de programmation de mort cellulaire sont aussi mis en jeu lors de la mise en place d'une IS. Suite à un traumatisme sévère (Kawasaki et al. 2006), il est observé une mortalité importante des DC par apoptose pouvant altérer de manière significative les fonctions des lymphocytes T et B, et contribuer ainsi à l'IS, le même phénomène est observé dans le sepsis (Hotchkiss et al. 2001 et 2002 ; Tinsley et al. 2003). Nous avons parlé précédemment de l'interaction DC et LT via la synapse immunologique, qui joue un rôle important dans l'inhibition de l'activation des lymphocytes T, et donc dans la mise en place de l'IS. Nous détaillerons un peu plus loin le phénomène de « T-cell exhaustion like » suite à un traumatisme sévère.

2.3.1 Lymphopénie et lymphocytes T régulateurs

La lymphopénie est caractérisée par une diminution importante du nombre des lymphocytes, condition favorable à l'installation d'une IS. Dans le cas du sepsis chez l'homme, l'apoptose abondante des lymphocytes B, des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ entraîne une lymphopénie (Hotchkiss et al. 2001 ; Boomer et al. 2011 ; Hotchkiss, Monneret, and Payen 2013). Celle-ci touche d'autres populations cellulaires chez les patients avec un traumatisme crânien comme les lymphocytes NKT et les cellules NK (Mrakovcic-Sutic et al. 2010).

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ (CD4⁺CD25⁺CD127⁻FOXP3⁺), possédant une fonction suppressive en inhibant la prolifération des lymphocytes T effecteurs CD4⁺CD25⁻. Les lymphocytes Treg jouent un rôle important dans la mise en place d'une IS (Wan 2010). Le choc septique et le sepsis ont pour caractéristique d'avoir une augmentation du pourcentage de Treg circulants : diminution du nombre de lymphocytes T effecteurs totaux, et maintien ou augmentation du nombre de Treg (Venet et al. 2004 ; Saito et al. 2008). Les patients sévèrement brûlés ont un niveau élevé de cytokines produites par les Treg, ainsi que des marqueurs d'activation de ces cellules qui semblent importants dans la pathogenèse du sepsis et la mortalité de ces patients (Huang et al. 2010). De même, une étude montre une expansion des lymphocytes Treg en périphérie chez les patients atteints de lésion médullaire chronique (Monahan et al. 2015).

2.3.2 Phénomène d'épuisement lymphocytaire T

Le phénomène d'épuisement lymphocytaire « Exhaustion », est un processus dans lequel les lymphocytes T perdent leur capacité à éliminer des pathogènes, des cellules infectées ou des cellules cancéreuses. La notion de « T-cell exhaustion » est apparue lors d'études sur le dysfonctionnement des lymphocytes T CD8⁺ au cours des infections chroniques virales (Shin and Wherry 2007). Les premiers travaux ont été réalisés chez des souris chroniquement infectées par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Zajac et al. 1998). Ce

phénomène d'épuisement a aussi été décrit dans d'autres modèles animaux infectieux avec d'autres virus : l'adénovirus (Krebs et al. 2005), Friend rétrovirus (Zelinsky et al. 2005), le virus d'immunodéficience de singe (SIV) (Vogel et al. 2001), et l'hépatite B (Reignat et al. 2002). Les lymphocytes T CD4⁺ sont aussi touchés par l'épuisement suite à une infection virale persistante (Brooks et al. 2005). Les lymphocytes T épuisés ont un phénotype distinct des autres lymphocytes T, par l'expression de différentes molécules comme : PD-1 et LAG-3, ou CD127 et CD62L, respectivement (Yi, Cox, and Zajac 2010). Cette perte de fonction de la part des lymphocytes est hiérarchisée (**Figure 13**) :

- 1- Diminution de l'activité cytolytique et de l'expression de la cytokine IL-2, stimulatrice des lymphocytes T (Balkhi et al. 2015) à un temps précoce.
- 2- Diminution importante de la production de TNF- α , alors que la production d'IFN- γ diminue plus tardivement (Wherry et al. 2003) à un stade plus sévère de l'épuisement des lymphocytes T.
- 3- Augmentation de l'apoptose des lymphocytes T.

De multiples récepteurs inhibiteurs ont été identifiés et associés au dysfonctionnement des lymphocytes T lors d'un épuisement de ces cellules, dans des modèles animaux avec une infection chronique (Blackburn et al. 2009). Parmi eux, le récepteur 1 de mort programmée (PD-1) est surexprimé pendant le phénomène d'épuisement lymphocytaire (Wherry 2011). Au cours des infections chroniques avec le LCMV ou le VIH, l'expression de PD-1 est augmentée sur les lymphocytes T CD8⁺ ; ces lymphocytes T épuisés perdent leur capacité à proliférer (Barber et al. 2006; Day et al. 2006). PD-1 est impliqué dans l'inhibition de la voie de signalisation qui régule la transcription d'IL-2 en inhibant la voie PI3K/Akt (Balkhi et al. 2015).

Lorsque l'interaction PD-1/PD-L1 est bloquée par des anticorps, cela entraîne un effet bénéfique sur la restauration des fonctions des lymphocytes T (Barber et al. 2006) comme : leur prolifération, leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, leur activité d'élimination des cellules infectées et des pathogènes. Ce phénomène d'épuisement lymphocytaire T est retrouvé chez les patients atteints de sepsis à l'origine de la phase d'IS (Boomer et al. 2011).

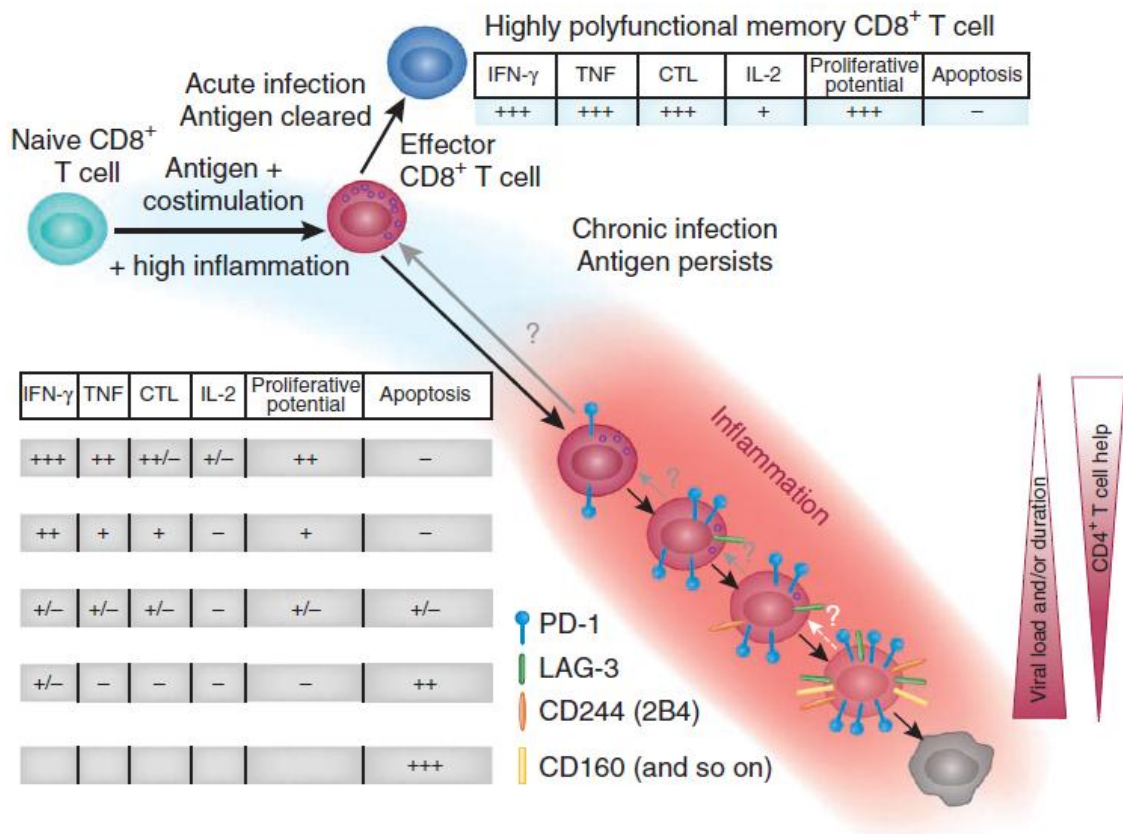


Figure 13: Hiérarchie d'apparition des marqueurs d'épuisement lymphocytaire pendant une infection chronique (Wherry 2011)

2.3.3 PD-1 : le récepteur 1 de mort programmée

La voie de signalisation de la famille B7-CD28 régule la balance entre l'inhibition et l'activation des cellules immunitaires face aux pathogènes et la tolérance du soi. Il existe une abondance des voies de signalisation inhibitrice cytoplasmiques de la famille B7-CD28 pouvant atténuer la réponse et promouvoir la tolérance des lymphocytes T. Le récepteur PD-1 (Programmed cell Death receptor 1) et ses ligands PD-1L (B7-H1 ou CD274) et PD-2L (B7-DC ou CD273) en font partie (Keir, Francisco, and Sharpe 2007) (**Figure 14**).

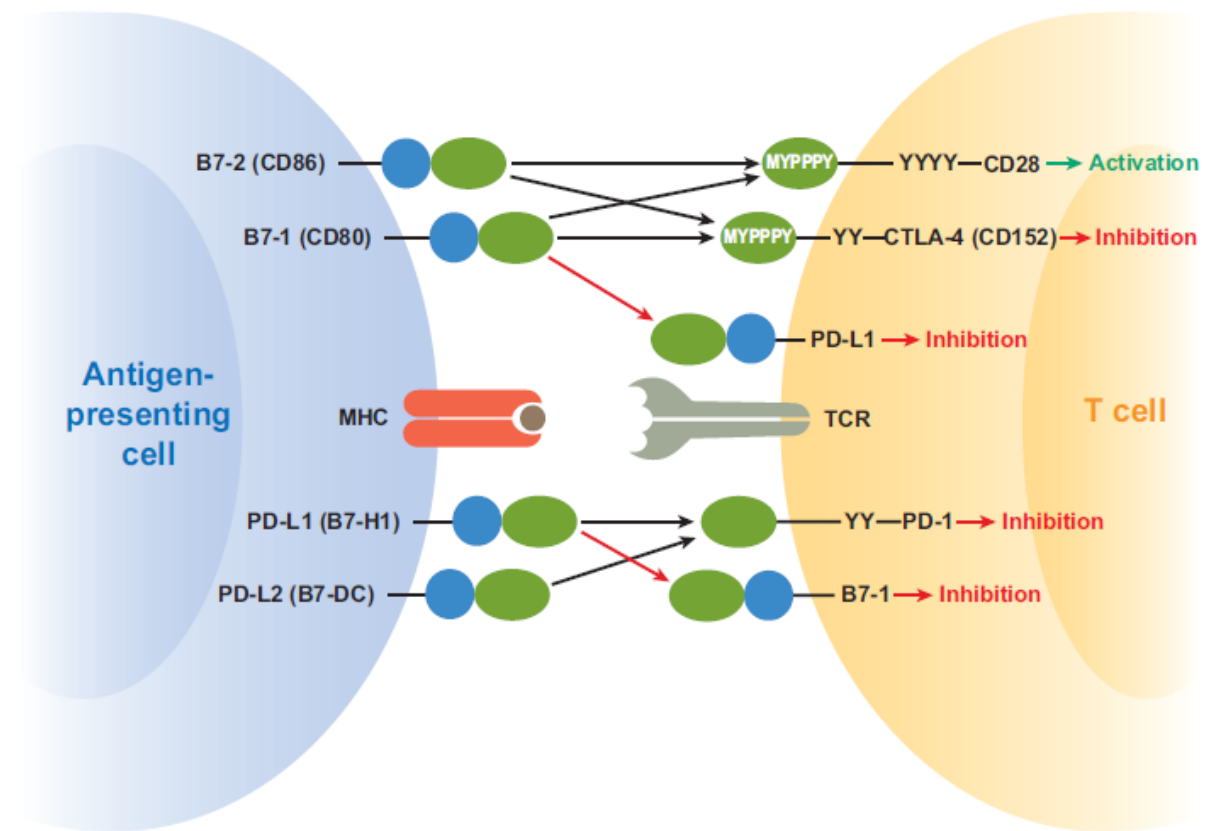


Figure 14: Interaction des voies de signalisation de la famille B7-CD28. Co-stimulateur d'inhibition de l'activation des lymphocytes T (Keir et al. 2008)

PD-1 est exprimé sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, les cellules NK et NKT, les lymphocytes B et les monocytes lors de leur activation (**Figure 15**). PD-1L est exprimé sur les lymphocytes B et T, ainsi que sur les cellules dendritiques et les macrophages. De plus, PD-1L est exprimé sur un grand nombre de cellules non hématopoïétiques telles que les cellules endothéliales vasculaires, les îlots de Langerhans du pancréas, les astrocytes, les cellules kératinocytes (**Figure 15**). L'interaction entre PD1 et ses ligands va activer une cascade de signalisation qui va inhiber l'activation, la différenciation, la prolifération des lymphocytes T et la production de cytokines par ces cellules (Latchman et al. 2001 ; Butte et al. 2007). Dans des conditions physiologiques normales, la fonction majeure de PD-1 est d'inhiber l'activité effectrice des lymphocytes T, et d'améliorer la fonction et le développement des Tregs (qui inhibent la réponse des lymphocytes T et préviennent une

hyper-stimulation de la réponse immune). PD-1 est aussi impliqué dans les phénomènes de tolérance (Okazaki and Honjo 2006 ; Francisco, Sage, and Sharpe 2010).

De récentes études ont montré que des infections virales ou parasitaires induisaient spécifiquement l'expression de PD-1L sur les DC induisant une anergie des lymphocytes T, et donc une paralysie du système immunitaire.

Les cellules cancéreuses expriment des antigènes à leur membrane qui sont reconnus par les cellules immunitaires de l'hôte, et pourront alors être reconnues comme néfastes pour l'organisme et donc détruites. Cependant, il existe des failles permettant aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire telles que l'expression de PD-1L à leur membrane, permettant l'inhibition de l'activation du système immunitaire via l'interaction avec PD1 sur les lymphocytes T.

En traumatologie, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells) et les lymphocytes des patients atteints de sepsis expriment le récepteur PD-1 (Boomer et al. 2011 ; Spec et al. 2015). Cependant l'expression de PD-1 n'est pas à lui seul un marqueur suffisant pour la mise en évidence d'une IS chez un patient traumatisé.

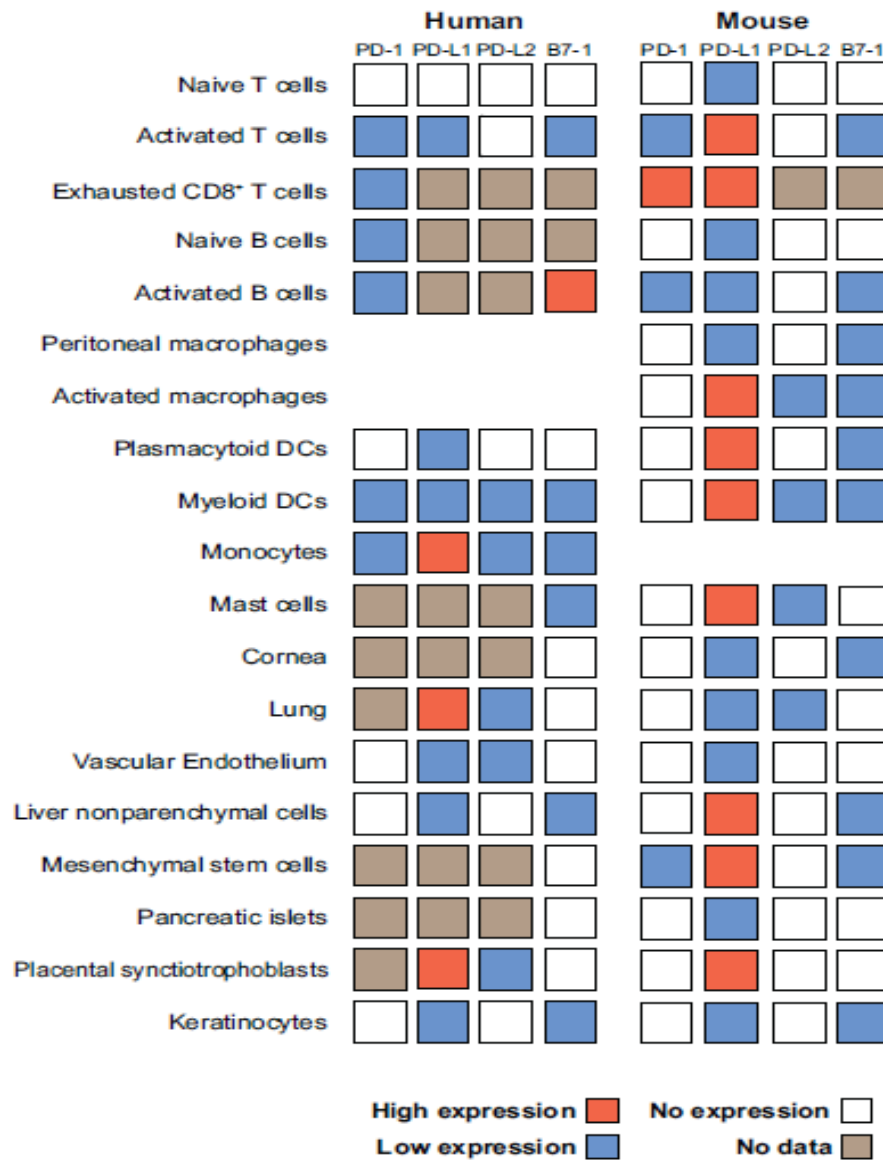


Figure 15: Comparaison de l'expression de PD-1, PD-1L, PD-2L et B7-1 sur différents types de cellules d'Homme ou de souris (Keir et al. 2008)

III- Modèles de traumatisme médullaire et traitements

1- Le modèle de traumatisme médullaire

Le modèle de traumatisme médullaire a été réalisé chez plusieurs espèces animales : le chat, le rat, la souris, le chien, le lapin, le cochon et les primates (Battistuzzo et al. 2012 ; Zhang et al. 2014) (**Tableau 2**).

Tableau 2: Modèles animaux de lésion médullaire utilisés pendant les 10 dernières années (Zhang et al. 2014)

	Experimental animal							Total
	Rat	Mouse	Dog	Rabbit	Pig	Primate	Guinea pig	
Number of articles	289	69	19	18	9	2	1	407

Il existe différents modèles de traumatisme médullaire (**Tableau 3**) : par ischémie/reperfusion (Lafci et al. 2013), par compression (Koozekanani et al. 1976), par induction photochimique (Piao et al. 2009), par transection de la moelle épinière (Min et al. 2011), par contusion unilatérale ou bilatérale (Anderson, Sharp, and Steward 2009 ; Seifert et al. 2011).

Tableau 3: Comparaison des différentes méthodes pour effectuer une lésion médullaire (Zhang et al. 2014)

Model	Animal	Methods	Characteristics
Ischemia/reperfusion injury model	Rat, mouse, swine, rabbit	Aortic cross-clamping; aortic occlusion	Suitable for spinal cord ischemia caused by thoracic or thoracoabdominal aortic aneurysm surgery with some complications
Traumatic injury model	Rat, dog	Allen's method (Koozekanani et al., 1976)	Classical, but lack of standardization of this injury model
	Rat Rat, guinea pigs	Modified NYU device Compressive injury model	Standardized and expensive Moderate chronic injury model for recovery or secondary dysfunction, and inflammatory response at the injury site
	Rat, mouse, pig	Tractive SCI model induced by a spinal distractor (Wang et al., 2011)	Cost-effective and reliable animal model
Completely transected	Rat, cat, mouse	Surgical incision	Acute model and low animal survival rate
Others	Rat	Photochemically induced, inflammatory injury model	Suitable for post-traumatic syringomyelia but not be widely used

Pour mettre en place un modèle de traumatisme médullaire il est nécessaire de réunir les conditions suivantes : 1- produire un traumatisme similaire au traumatisme médullaire clinique ; 2- le modèle doit être contrôlé, reproductible et stable ; 3- la technique utilisée pour

effectuer la lésion médullaire doit être simple à réaliser ; 4- l'équipement utilisé pour la mise en place du modèle doit être simple et facile d'accès (Akhtar, Pippin, and Sandusky 2008).

1.1 Localisation de la lésion médullaire

La localisation de la lésion médullaire est importante et joue un rôle dans la sensibilité à une infection pulmonaire ainsi que dans la mise en place d'une IS. Sur la **Figure 16**, nous pouvons observer l'innervation des organes par le système nerveux sympathique entre les vertèbres thoraciques T1 à T12 et les vertèbres lombaires de L1 à L5 (Brommer et al. 2016). L'innervation des organes se fait à différents niveaux des vertèbres, et en conséquence, en fonction du niveau de la lésion sur les vertèbres thoraciques, les synapses neuro-immunologiques ne seront pas affectées de la même manière (Brommer et al. 2016).

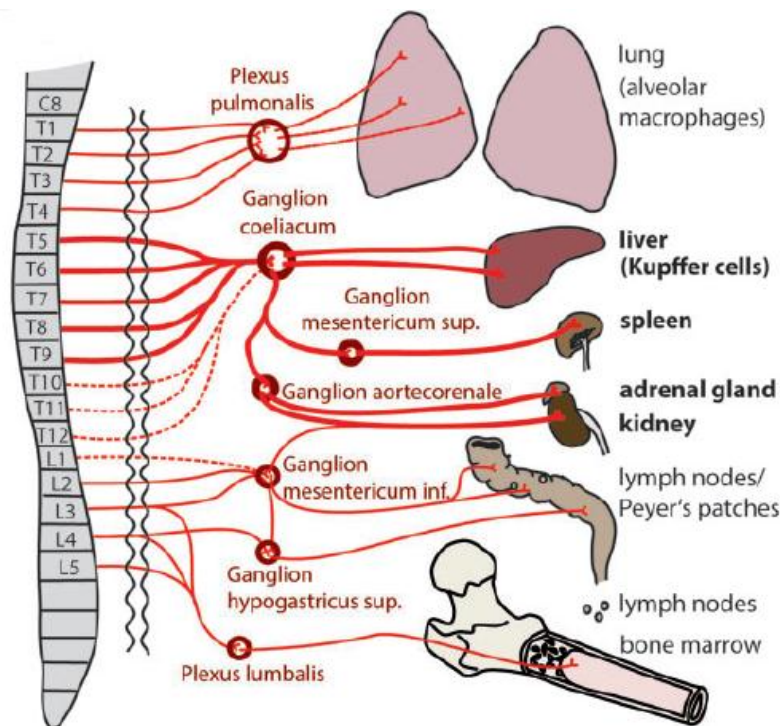


Figure 16: Innervation des organes par le système nerveux sympathique entre les vertèbres thoraciques T1 à T12 et les vertèbres lombaires de L1 à L5 (Brommer et al. 2016)

Une potentielle complication d'une lésion médullaire haute, chez la souris, est la dysréflexie autonome caractérisée par l'activation exagérée du système nerveux sympathique pouvant causer des embolies pulmonaires, des accidents vasculaires cérébraux, ou un décès des souris étudiées (Zhang et al. 2013). Une lésion au niveau de la vertèbre thoracique T3 perturbe l'innervation du système nerveux sympathique de la rate, alors qu'une lésion au niveau T9 épargne presque entièrement les innervations sympathiques spléniques. Dans des conditions physiologiques, les signaux sympathiques d'excitation sont commandés par une inhibition supra-spinele. Suite à une lésion médullaire en T3, il y a une perte de contrôle de l'activité sympathique (Lucin, Sanders, and Popovich 2009), en faveur d'une forte excitation du système sympathique entraînant alors un relargage de noradrénaline au niveau de la rate (Figure 17).

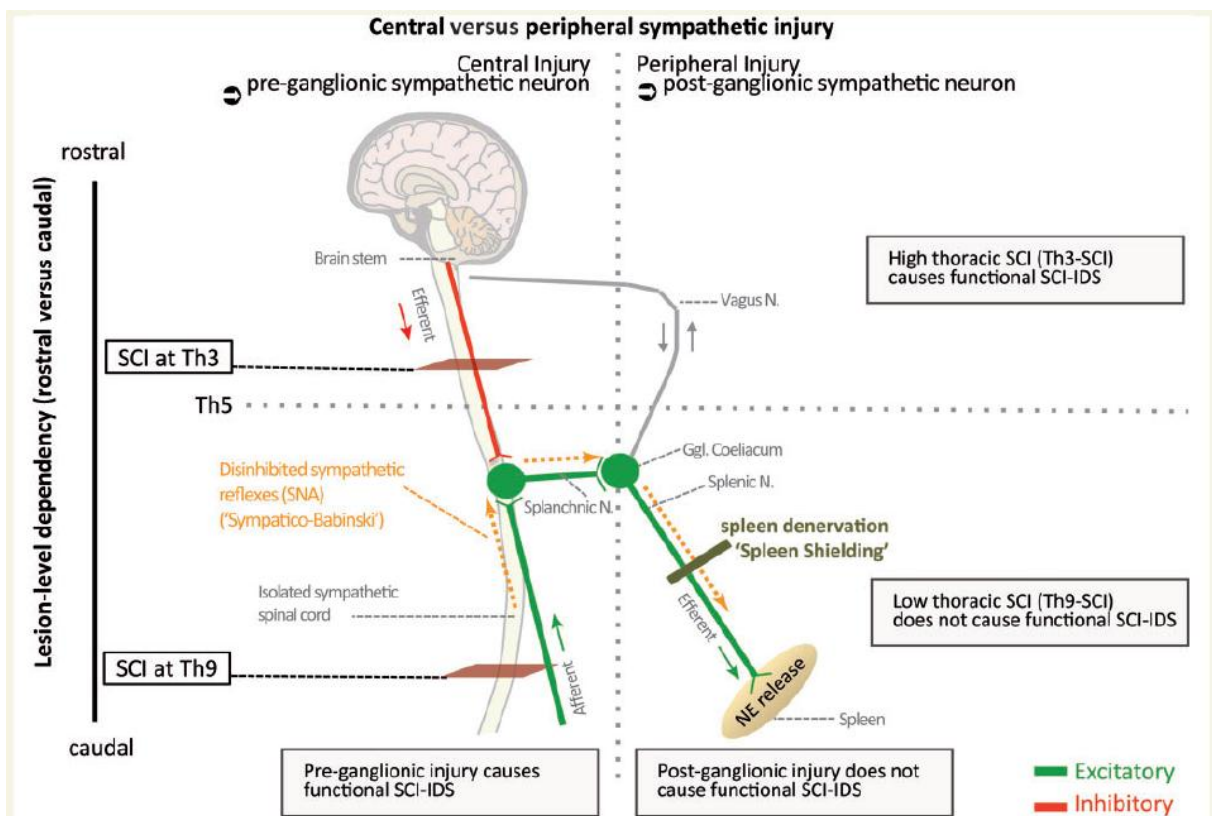


Figure 17: Pathophysiologie et signalisation du système nerveux sympathique suite à une lésion médullaire haute en position T3 ou T9, entraînant ou non une immunosuppression (SCI-IDS) (Brommer et al. 2016)

L'augmentation de la production de noradrénaline dans la rate lors d'une lésion médullaire en T3, entraîne une réduction drastique des réponses pro-inflammatoires (Lucin et al. 2007), et augmente l'apoptose des leucocytes et tout particulièrement des lymphocytes B (Lucin, Sanders, and Popovich 2009).

Suite à une lésion médullaire haute au niveau T3, plusieurs études ont montré une atrophie splénique, en parallèle à une apoptose massive, une diminution du nombre des lymphocytes T et B, des cellules dendritiques et des macrophages (Lucin et al. 2007 ; Zhang et al. 2013), et des cellules NK résiduelles de la rate (Laginha et al. 2016). Aucun de ces paramètres ne sont retrouvés dans les traumatismes médullaires avec une lésion plus basse, située en T9 par exemple (Zha et al. 2014).

1.2 Syndrome d'immunosuppression après un traumatisme médullaire (SCI-IDS)

Des études humaines et murines ont montré la présence d'un syndrome d'immunosuppression suite à un traumatisme médullaire (SCI-IDS), mais il existe très peu de données publiées concernant les conséquences du SCI-IDS sur le devenir des patients ou des animaux dans les modèles expérimentaux. Le SCI-IDS est caractérisé par différents marqueurs comme la diminution de la capacité des monocytes à présenter des antigènes du fait de la diminution d'expression membranaire du CMH-II (Riegger et al. 2007 ; Riegger et al. 2009), la présence d'une lymphopénie (Lucin et al. 2007 ; Zhang et al. 2013), et une augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Muehlstedt, Lyte, and Rodriguez 2002). Récemment, il a aussi été démontré que le SCI-IDS pouvait impliquer une augmentation de l'expression de protéines inhibitrices à la membrane des lymphocytes T comme PD-1, marqueur d'épuisement lymphocytaire T (Zha et al. 2014). La pneumonie bactérienne est la complication précoce majeure faisant suite à un SCI-IDS, et elle est associée à l'augmentation de la mortalité chez les patients atteints d'une lésion médullaire ainsi qu'à un moins bon devenir neurologique (Failli et al. 2012 ; Roquilly et al. 2015). Dans notre modèle SCI-IDS de souris, ces différentes caractéristiques ont été validées.

2- Molécules activatrices du système immunitaire inné pour traiter l'IS du patient de réanimation

2.1 Thérapies classiques en traumatologie : IFN- γ , GM-CSF, MPLA, hydrocortisone

Face à l'émergence de bactéries multirésistantes, de nouvelles thérapies ont été évaluées ; elles ont pour but l'activation du système immunitaire, et elles permettraient de diminuer l'incidence des infections chez les patients traumatisés sévères ou septiques.

2.1.1 L'IFN- γ

L'utilisation d'IFN- γ a pour but d'activer la réponse immunitaire, et d'améliorer l'élimination des pathogènes. L'efficacité de l'IFN- γ recombinant a été démontrée chez des patients traumatisés sévères (Polk et al. 1992). La thérapie par l'IFN- γ chez les patients présentant un sepsis permet aux monocytes de retrouver leur fonction en terme :

- 1) de reconnaissance et d'élimination du pathogène par la restauration de l'expression du CMH-II (ou HLA-DR)
- 2) de réversion des phénomènes de tolérance : production de TNF- α suite à une stimulation par du LPS de cultures de sang total *ex vivo*,
- 3) de fonction de phagocytose entraînant une clairance bactérienne (Döcke et al. 1997).

Il convient de signaler que de nombreuses études et d'essais cliniques ont montré une inefficacité de l'IFN- γ probablement du fait de mauvais critères de sélection des patients traumatisés selon l'expression d'HLA-DR, de dose administrée variable, ou encore de fréquences d'administration inadéquates (Turina et al. 2006).

2.1.2 Le GM-CSF

Le GM-CSF (« Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor ») est un important facteur de croissance hématopoïétique immuno-modulateur (Burgess and Metcalf 1980). Le GM-CSF stimule la prolifération, la différenciation, la maturation des monocytes et des granulocytes (Hamilton 2002). Dans un modèle de choc septique murin, l'exposition au GM-CSF de souris immunodéprimées entraîne une augmentation de l'expression du TNF- α par les macrophages, après une stimulation au LPS (Flohé et al. 2008). Comme mentionné précédemment, l'une des caractéristiques principales de l'IS en traumatologie est la diminution de l'expression du CMH-II sur les monocytes sanguins. La thérapie par le facteur de croissance GM-CSF permet de restaurer l'immunocompétence des monocytes par l'augmentation de l'expression de HLA-DR chez des patients atteints de sepsis, et permet de diminuer la durée de ventilation mécanique et la durée de séjour en réanimation (Meisel et al. 2009). Le GM-CSF administré ex-vivo sur des cultures cellulaires restaure également la production de cytokines pro-inflammatoires des monocytes en augmentant l'expression des récepteurs TLR2 et TLR4 (Meisel et al. 2009). Cependant, les données publiées restent encore insuffisantes pour recommander l'utilisation du GM-CSF chez les patients traumatisés.

2.1.3 Le MPLA

L'adjuvant vaccinal monophosphoryl lipid A (MPLA). Le MPLA est un fragment purifié de LPS, agoniste du TLR-4, contenant un adaptateur protéique induisant la production d'IFN de type I et la maturation des cellules dendritiques. Le MPLA a été étudié dans un modèle de choc hémorragique chez la souris et son action permet la restauration des capacités de présentation d'antigène des cellules dendritiques, et inhibe la surexpression de l'ARNm de l'IL-10 dans les cellules NK, suite à une pneumonie à *Staphylococcus aureus* (Roquilly et al. 2013).

2.1.4 L'hydrocortisone

L'hydrocortisone qui est une hormone stéroïde présente naturellement dans l'organisme, a un effet anti-inflammatoire. Chez les patients intubés polytraumatisés, la thérapie par l'hydrocortisone diminue le risque de pneumonie nosocomiale (Roquilly A et al. 2011). Une étude dans le modèle murin de choc hémorragique montre que l'hydrocortisone prévient l'IS en réduisant le niveau d'expression de l'IL-10 (Roquilly et al. 2014). Chez les patients avec un traumatisme crânien, l'hydrocortisone a pour effet de diminuer le nombre de lymphocytes B producteurs d'IL-10 (Chenouard et al. 2015). L'hydrocortisone, qui est habituellement perçue comme un immunosuppresseur, peut dans un contexte inflammatoire s'avérer avoir des propriétés immunostimulantes.

2.2 Nouveau traitement : L'immunothérapie par anticorps bloquant anti-PD-1

2.2.1 L'immunothérapie en cancérologie

L'expression de PD-1L est corrélée à un mauvais pronostic pour différents types de carcinomes : rénal (Thompson et al. 2006), gastrique (Wu et al. 2006), cancer du sein (Ghebeh et al. 2006) et œsophage (Ohigashi et al. 2005). Les stratégies thérapeutiques utilisant des anticorps anti-PD1 permettent la stimulation du système immunitaire en bloquant l'interaction PD-1L/PD1, améliorent ainsi l'efficacité des traitements ciblés contre des cellules cancéreuses (**Figure 18**). Les premières études sur le mélanome ont montré que l'immunothérapie avec un anticorps bloquant anti-PD-1 induisait un bénéfice clinique durable (Ott, Hodi, and Robert 2013).

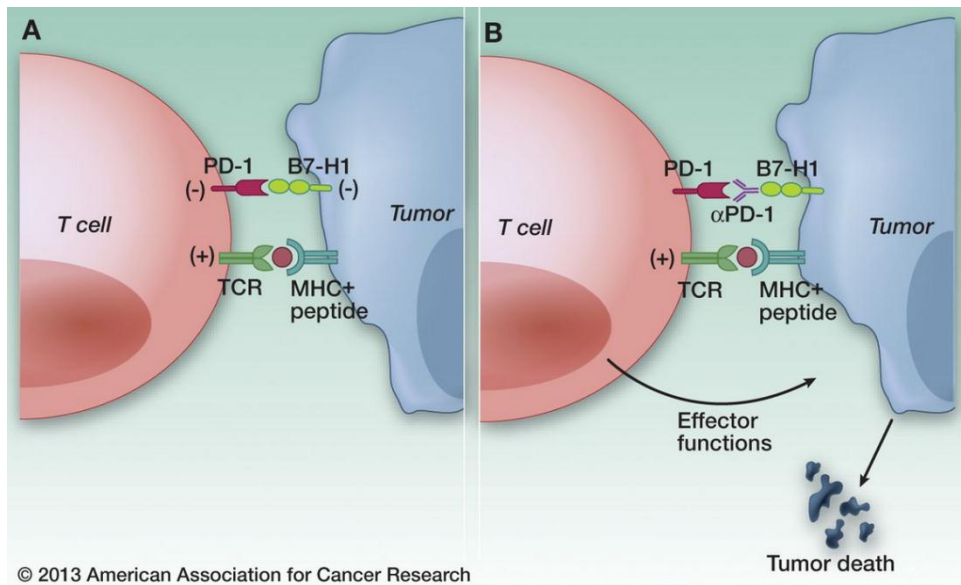


Figure 18: PD-1 et cancer. A- L'interaction de PD-1 avec B7-H1 induit l'inhibition de la fonction effectrice des cellules T. B- Blocage de cette interaction par un anticorps anti-PD1 ; les lymphocytes T maintiennent leur fonction anti-tumorale (Sznol and Chen 2013)

2.2.2 L'immunothérapie en traumatologie

Au cours du choc septique, les cellules mononuclées sanguines (PBMC) des patients expriment le récepteur PD-1 (Boomer et al. 2011). A l'heure actuelle, seules des études sur des modèles animaux de sepsis démontrent l'efficacité de l'immunothérapie par anticorps anti-PD-1 ou anti-CTLA-4. Dans un modèle de sepsis bactérien murin, l'administration de l'anticorps anti-PD-1 reverse le dysfonctionnement immunitaire et permet d'améliorer la survie des souris (Brahmamdham et al. 2010 ; Hotchkiss, Monneret, and Payen 2013). Une autre étude, cette fois-ci sur un modèle murin de sepsis fongique, montre l'effet bénéfique sur la survie des animaux de l'immunothérapie avec différents anticorps immunomodulateurs : l'anti-PD-1, l'anti-PD-1L et l'anti-CTLA-4 (Chang et al. 2013). Le but de notre travail a été de développer une nouvelle stratégie thérapeutique contre l'IS par l'utilisation d'un anticorps anti-PD-1 dans un modèle de traumatisme médullaire chez la souris.

Problématique/Objectifs de l'étude

La première partie de notre travail a consisté en la mise en place du modèle murin de lésion médullaire aiguë au sein du laboratoire, et à sa validation en terme de dysfonction immunitaire. En effet, il était nécessaire de retrouver des critères anatomiques, physiologiques, moléculaires et cellulaires similaires à ceux retrouvés en clinique. Pour les critères moléculaires et cellulaires, nous nous sommes focalisés sur la réponse immunitaire suite au traumatisme médullaire compliqué d'une pneumonie à *S. aureus*. La majorité des critères ont été étudiés à différents temps post-opératoires, avec et sans pneumonie à *S. aureus*, dans le but de déterminer le temps le plus propice à la mise en place de l'IS.

Suite à cette validation, nous avons cherché à savoir si nous retrouvions l'expression de PD-1 sur les cellules immunitaires spléniques, suite à l'IS. Puis, nous avons utilisé une thérapie innovante en traumatologie par l'immunothérapie par anticorps anti-PD-1, dans le but de stimuler le système immunitaire et d'éviter cette IS délétère face aux pathogènes.

La partie résultat est présentée en deux parties : la première partie correspond à la validation de notre modèle de souris de traumatisme médullaire, et la seconde partie correspond à l'évaluation du traitement par immunothérapie par l'anticorps anti-PD1.

Matériel & Méthode

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1- Soins aux animaux

Les expériences ont été menées en conformité avec les principes de protection des animaux de laboratoire (National Institutes of Health, 1985). Le comité d'éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire a approuvé toutes les expériences sur les animaux dans cette étude, avec la saisine N°02275-01 pour la validation du modèle murin de traumatisme médullaire, ainsi que la saisine N° 5225 pour l'immunothérapie sur ce même modèle animal. Les souris femelles SWISS âgées de 4 semaines (17-20g), et les souris BALBc âgées de 8 semaines mais de même poids que les souris SWISS (17-20g) sont fournies par le laboratoire JANVIER (Le Genest Saint Isle, France). Les souris BALBc sont congéniques et sont utilisées pour l'étude du CMH-II. Les souris sont maintenues sur un cycle lumière / obscurité de 12 h avec un accès libre à la nourriture dans la litière, et à l'eau dans un couvercle de boîte de Pétri, disposées directement dans la litière. Après la procédure de chirurgie, la litière est changée tous les 2 jours afin d'éviter toute infection.

2- Analgésie et euthanasie des animaux

La buprénorphine (morphinomimétique, Buprécare, 0,3mg/mL) est injectée en sous-cutanée à une concentration de 60µg/mL (ou 0,1mg/kg), 30 min avant la chirurgie et 6h post-opératoire, ce qui permet de prolonger l'effet de l'analgésique durant les 24 premières heures. En suivant les recommandations pour les modèles animaux sévères, les souris ont reçu deux injections par jour de buprénorphine à 60µg/mL pendant 3 jours. L'euthanasie est effectuée par inhalation continue d'isoflurane, puis par dislocation cervicale.

3- Protocole chirurgical de lésion médullaire (SCI)

La dislocation rachidienne est faite sous anesthésie générale par isoflurane inhalé en continu (2,5% d'isoflurane, 1L/min d'oxygène). La durée de l'intervention chirurgicale est d'environ 10 à 15 minutes par souris. La surface cutanée dorsale au niveau des vertèbres thoraciques a été désinfectée avec une solution antiseptique iodée afin de réduire les risques d'infection. Une incision longitudinale d'environ 2 cm de la peau est alors effectuée avec un

scalpel. Il s'en suit une incision au niveau du muscle du trapèze, proche de la limite du muscle dorsal central permettant un accès sous le trapèze. La veine dorsale a été partiellement thermo-coagulée afin d'éviter toute hémorragie. Puis, avec un ciseau de dissection d'iridectomie, une lésion médullaire mécanique est induite entre les vertèbres thoraciques T3 à T9. Pour être certain que la lésion médullaire est réalisée, une rétraction des membres inférieurs est observée durant l'incision. Enfin, la peau est refermée par des sutures simples séparées avec du fil Dafilon 5/0, DS19 bleu, non-résorbable (B. Braun Medical SAS, Boulogne-Billancourt, France). Durant et après la procédure chirurgicale, les souris sont placées sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie. En post-opératoire, les souris SCI (ayant la lésion médullaire) présentent une paraplégie bilatérale. Dans 2 à 3% des cas les souris SCI sont monoplégiques, et elles sont alors exclues de l'étude. Les souris témoins Sham ont subi la même procédure chirurgicale que les souris SCI, à l'exception de l'incision entre les vertèbres thoraciques conduisant à la lésion médullaire.

4- Protocole de pneumonie

La souche ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM) est mise en culture dans un bouillon cœur-cerveau (BCC) pendant 18h à 37°C, sous agitation. Après avoir effectué 2 lavages (2500 rpm pendant 10 min à 20°C) avec de l'eau physiologique stérile, la charge bactérienne est calibrée par néphélométrie à 7.0 McF, correspondant à une turbidité bactérienne de $5,0 \times 10^8$ UFC/mL. La charge bactérienne de SASM est ensuite concentrée 10 fois, pour obtenir un inoculum à $5,0 \times 10^9$ UFC/mL. 75µL de cette solution sont injectés par sonde intratrachéale de 24 gauges, sous anesthésie par isoflurane inhalé. La charge bactérienne injectée par souris correspond environ à $2,6 \times 10^8$ UFC. La concentration de la charge bactérienne est contrôlée par culture quantitative sur géloses Trypticase Soja, ou sur gélose Chapman qui permet de mieux identifier les colonies de *Staphylococcus aureus* qui sont jaunes sur ce milieu de culture.

5- Groupes d'animaux durant l'étude

Deux groupes ont été étudiés : le groupe « SCI » avec les animaux ayant subi la lésion médullaire, et le groupe « Sham » qui a exactement la même procédure chirurgicale que les souris SCI, mais sans lésion médullaire.

6- Coupe histologique et plugin SIOX dans le logiciel Fiji

Les poumons des souris sont prélevés à différents temps suite à la mise en place du traumatisme médullaire (24h, 48h, 72h, 96h) en présence ou non d'infection à SASM (24h, 48h post-infection), et immédiatement fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% durant 48h. La plateforme MicroPICell a effectué les coupes de poumons avec une coloration par Hematoxyline-Phloxine-Safran (HPS). Les lames sont ensuite passées au scanner de lame Nanozoomer HAMAMATSU, et analysées par le logiciel NDPview (Nano Zoomer Digital Pathology). Pour chaque coupe histologique, entre 6 à 8 champs ont été collectés et analysés par la fonction SIOX (Single Integrative Object Extraction) du logiciel Fiji. Le tissu et les vaisseaux sanguins (foreground) sont différenciés de l'espace alvéolaire (background). Le pourcentage d'espace alvéolaire a été calculé à partir du nombre de pixels d'espace alvéolaire, par rapport au pourcentage de pixel total de l'image.

7- Croissance et dissémination bactérienne

Les poumons et la rate ont été broyés mécaniquement en condition stérile dans 1mL d'eau physiologique. L'homogénat des organes a été soumis à des séries de dilution d'un facteur 100, et mis en culture à 37°C. Le milieu Chapman est utilisé pour identifier les colonies de *Staphylococcus aureus*. Quarante-huit heures après incubation, les colonies sont comptées et les résultats sont exprimés en log₁₀ unité formant colonies (UFC) par gramme d'organe.

8- Préparation de l'homogénat de poumons et de rate pour test ELISA et détermination du niveau de cytokine par échantillon

Les poumons et la rate sont homogénéisés mécaniquement dans du tampon de lyse à 4°C (PBS 1X 0,1% de Triton X-100) contenant 1% de cocktail d'inhibiteur de protéases (Sigma, Paris, France). Les homogénats sont ensuite centrifugés à 12000 rcf pendant 20 min à 4°C, aliquotés et stockés à -80°C. Les concentrations d'IL-1, de TNF- α , d'IL-12, d'IL-10 et d'IFN- γ sont quantifiées par ELISA (eBioscience affymetrix, Paris, France), ainsi que la chimiokine KC (R&D Systems, Lille, France). La concentration de protéines dans les échantillons est déterminée en utilisant la méthode de Bradford.

9- Évaluation de la production de TNF- α par les cellules du sang en présence de LPS

La stimulation par lipopolysaccharide (LPS, agoniste TLR4) de cultures cellulaires de sang total a déjà été décrite (Asehnoune et al. 2006). Un prélèvement de sang total (0,5mL) est réalisé par ponction intracardiaque avec une seringue contenant de l'héparine sur animal anesthésié, puis dilué au 1/5^{ème} dans du milieu RPMI-1640 (Glutamax®, Gibco-LifeTechnologies, Paisley, UK) supplémenté avec des antibiotiques (pénicilline: 100 U/mL, Panpharma, Luitré-Fougères, France et streptomycine : 100 μ g/mL, Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France). Deux cents microlitres de sang dilué sont ensuite déposés dans chaque puits d'une plaque 96 puits et mis en culture en présence ou non de LPS [1ng/mL] (*E. coli* O111:B4, Sigma, 38297 Saint Quentin-Fallavier, France) à 37°C, 5% de CO² pendant 24h. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 2100 rpm pendant 2 min à 4°C, et le surnageant est stocké à -80°C, pour une analyse de la production du TNF- α par la méthode ELISA.

10- Détermination de l'expression des ARNm IL-12, IFN- γ et IL-10 par qRT-PCR dans les cellules CD11c spléniques

Les cellules spléniques CD11c ont été isolées par sélection positive avec des billes magnétiques anti-CD11c incubées pendant 15 min à 4°C (Miltenyi Biotec, Paris, France). La totalité des ARN de ces cellules a été isolé grâce au réactif Trizol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Du chloroforme est ajouté aux cellules qui sont dans du Trizol. Après 2 min à

température ambiante puis centrifugation (12000g, 15min à 4°C), trois phases se forment : une phase rouge (inférieure) contenant les protéines, une phase blanche (intermédiaire) contenant l'ADN et une phase translucide (supérieure) contenant les ARN. La phase translucide est transférée dans un nouveau tube, et 0,5mL d'alcool isopropyl par millilitre de Trizol sont ajoutés, pendant 10min à température ambiante, puis centrifuger (12000g, 10min 4°C). Le surnageant est enlevé, et 1mL d'éthanol 75% par millilitre de Trizol est ajouté, puis centrifuger (12000g, 5min à 4°C). L'alcool est retiré, il reste le culot d'ARN à laisser sécher, puis le mettre dans 20µL d'eau ultra-pure.

Un microgramme d'ARN a été utilisé pour la rétro-transcription avec la transcriptase reverse Superscript III (Invitrogen) et 1µL d'ADN complémentaire de la solution a été utilisé pour la PCR quantitative en temps réel dans le BioRadCycleriQ en utilisant le Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen, France). Cette procédure de PCR quantitative consiste à 45 cycles de 30 secondes à 95°C suivis de 30 min à 60°C. Les séquences des primers ont été sélectionnées par "pick primer", logiciel NCBI, pour l'IFN γ , L'IL-10, L'IL-12p40 et la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Les séquences correspondantes sont : 5'-CATCGGCTGACCTAGAGAAGAC-3' et 5'-GCAGTGTGTAGCGTTCATTGTC-3' (mIFN- γ -F et mIFN- γ -R), 5'-TGGCATGAGGATCAGCAGGG-3' et 5'-GGCAGTCCGCAGCTCTAGG-3' (mIL10-S et mIL10-R), 5'-TGTGGAATGGCGTCTCTGTCTG-3' et 5'-CAGTTCAATGGGCAGGGTCTCC-3' (mIL12p40-F et mIL12p40-R), 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' et 5'-ACCTTGCCCACAGCCTTG-3' (mGAPDH-F et mGAPDH-R) (Sigma-Aldrich, France). L'expression de GAPDH a été utilisée comme valeur de référence pour la normalisation du niveau d'expression de chaque gène. L'expression quantitative génique a été calculée avec la méthode 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak and Schmittgen 2001) en les calibrant avec les cellules spléniques CD11c⁺ des souris Sham.

11- Suspension cellulaire de splénocytes

Après euthanasie des animaux, les cellules de la rate sont isolées comme précédemment décrit (Broquet et al. 2014). Les rates sont prélevées, puis disséquées en petits morceaux avec des ciseaux, et digérées avec 2mg/mL de collagenase D (Roche Diagnostics, Meylan, France) dans 10mL de milieu RPMI-1640 10% SVF à 37°C pendant 30min. Dans chaque échantillon, 100µL d'EDTA sont ajoutés pour stopper l'action de la collagénase. Les rates sont ensuite broyées sur un filtre de nylon de 70µm (Dutscher ref 352350). Les cellules sont lavées dans du PBS1X-EDTA-BSA 0,1% et centrifugées (2100rpm, 10min à 4°C). Afin de lyser les érythrocytes, le culot cellulaire est incubé avec 3mL de tampon de lyse des globules rouges 1X (Ozyme cat 420301), pendant 5 minutes à température ambiante, et 7mL de PBS1X-EDTA-BSA 0,1% sont ajoutés pour stopper la réaction de lyse. Les échantillons sont centrifugés (2100rpm, 10min à 4°C). Une fois le surnageant retiré, 1mL de PBS1X-EDTA-BSA 0,1% est ajouté aux cellules. Dans une plaque 96 puits, 100µL d'échantillon de cellules de souris Sham, ou 200µL d'échantillon de cellules de souris SCI, sont disposés par puits prêt à être marqués par des anticorps, pour les expériences de cytométrie en flux. Le volume d'échantillon des cellules Sham utilisé est plus petit que pour les souris SCI à 48h et 72h post-opératoire, car il y a beaucoup plus de cellules chez les souris Sham.

12- Marquage des splénocytes pour la cytométrie en flux

Tous les échantillons sont incubés avec les anticorps anti-souris monoclonaux de marquage membranaire extracellulaire pendant 20 min à 4°C. Les anticorps anti-souris utilisés dans le marquage membranaire extracellulaire sont les suivants : CD3ε-BV711 (clone 145-2C11), CD4-BV711 (clone RM4-5), CD8-BV510 (clone 53-6.7), CD11c-BV421 (clone HL3), CD11b-BV737 (clone M1/70), NK1.1-BV421 (clone PK136), NKp46-BV421 ou PE (clone 29A1.4), CD48R-PE-CF594 (B220, clone RA3-6B2), CD69-BV510 (clone H1.2F3), CD28-PE-CF594 (clone 37.51), et CD274-BV711 (PD-L1, clone MIH5) de BD Horizon; CD4-A700 (clone RM4-5), KLRG1-A488 (clone 2F1), CD279-APC (PD-1, clone J43), NKp46-A700 (clone 29A1.4), CD80-FITC (clone 16-10A1) CD86-PE (clone GL1) de BD Pharmingen; CD11c-PECy7 (clone N418), IA[d]-BV421 (clone M5/114.15.2) de

Biolegend; CD3-PE et APC (clone 145-2C11), CD8-A488 (clone 53-6.7), NK1.1-PE (clone PK136), CD107a-A488 (clone bio1D4B) d'eBioscience. Les cellules mortes ont été exclues par l'utilisation de colorant de viabilité eFluor780 de chez eBioscience. Si l'analyse par cytométrie en flux n'est pas effectuée le jour même du marquage par les anticorps, les cellules sont fixées avec du PBS 1X paraformaldehyde 4% (10 minutes à 4°C), lavées et resuspendues dans du PBS 1X BSA 0,1%.

Le kit de fixation et perméabilisation (BD Bioscience) a été utilisé pour le marquage de molécules en intracellulaire. Les échantillons ont été ensuite incubés avec les anticorps monoclonaux anti-souris pour le marquage intracellulaire pendant 30 min à 4°C, avec les anticorps suivants : CTLA-4-PE (clone UC10-4F10-11) de BD Pharmingen; IL-10-BV421 (clone JES5-16E3) de BD Horizon; IFN- γ -APC (clone XMG1.2) et IL-10-APC (clone JES5 16E3) d'eBioscience.

Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS 1X BSA 0,1%. Enfin, après centrifugation, 90 μ L de billes de comptage (BD Bioscience) sont mises dans 15mL PBS 1X BSA 0,1% et 200 μ L de cette solution sont ajoutées aux cellules afin de déterminer par l'analyse au cytomètre le nombre de cellules présentes dans chaque échantillon. Les cellules ont été analysées en utilisant le cytomètre LSRII de chez BD, et quantifiées grâce au logiciel Flow Jo.

13- Traitement anticorps anti-PD1

À 24 heures et 48 heures post-opératoires, 500 μ L d'anticorps anti-PD1 (clone RMP1-14, BioXCell, Euromedex, Souffelweyersheim, France), ou d'anticorps de rat isotype control Ig2a sont injectés 1 fois par jour à une concentration de 0,2mg/kg ou à 10mg/kg, en intrapéritonéal. La dose de 0,2mg/kg (correspondante à 4 μ g/souris) a été utilisée pour l'ensemble des expériences. Dans l'expérience de survie, deux doses ont été testées : 0,2mg/kg et 10mg/kg (correspondante à 200 μ g/souris).

14- Analyse statistique

Toutes les données expérimentales sont représentées en médiane écart interquartile (25%-75%), et ont été reproduites de deux à trois fois de manière indépendante. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque expérience est indiqué dans la légende des figures. Les tests statistiques non paramétriques utilisés sont le test de Mann-Whitney pour la comparaison de deux groupes, et le test de Kruskal-Wallis pour la comparaison de plusieurs groupes avec utilisation du test *post-hoc* de Dunn pour les comparaisons entre deux groupes intragroupes en cas de significativité du test de Kruskal-Wallis. Le logiciel Graph Pad prism version 6 (San Diego, CA, USA) est utilisé pour l'analyse statistique. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Résultats

RÉSULTATS

1- La lésion médullaire thoracique haute sensibilise à une pneumonie à SASM

1.1 La lésion médullaire haute (SCI)

La présence ou non de la lésion médullaire a été observée en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (**Figure 19** A et B). Le groupe Sham ne présente pas de dislocation médullaire, la colonne vertébrale apparaît intacte et normale (**Figure 19** A). La présence d'un hématome près de la lésion médullaire chez les souris SCI permet de mettre en évidence cette lésion au niveau de la moelle épinière (**Figure 19** B). Le succès de la procédure chirurgicale par la présence de la lésion médullaire thoracique haute est visible grâce à la présence d'une paraplégie bilatérale, après le réveil des animaux. Au cours du temps, suite à une lésion médullaire, les animaux perdent jusqu'à 20% de leur poids initial, certainement dû à l'atrophie des muscles des membres postérieurs. En conséquence, cela ne représente pas un point limite qui nécessiterait l'euthanasie systématique des animaux.

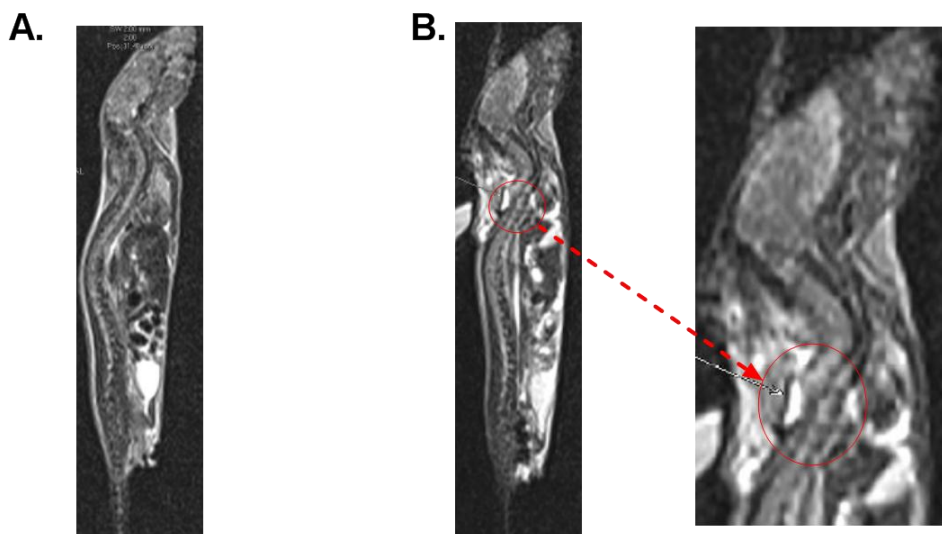


Figure 19: Observation par Image à Résonance Magnétique (IRM) du profil droit de souris Sham et SCI. (A) IRM de souris Sham (B) A gauche, IRM de souris SCI ; A droite, un zoom de l'IRM SCI avec la dislocation médullaire et l'œdème entouré en rouge. SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire.

1.2 Le traumatisme médullaire sensibilise les animaux à une pneumonie à SASM

Il a été montré que le traumatisme médullaire induit un syndrome d'immunodépression (SCI-IDS) qui augmente la sensibilité aux infections comme la pneumonie (Brommer et al. 2016). Nous avons étudié la sensibilité des souris SCI à une pneumonie induite par SASM. Trois temps d'induction de l'infection ont été étudiés : 1 jour post-opératoire (D1), 3 jours post-opératoires (D3) et 8 jours post-opératoires (D8), puis la survie des souris a été déterminée sur 10 jours, correspondant à 240 heures (**Figure 20**). Lorsque l'infection est induite à D1, 20% de mortalité est observé dans les deux groupes, Sham et SCI (**Figure 20 A**). Une différence significative de mortalité entre les deux groupes de souris Sham et SCI est observée lorsque la pneumonie est induite à D3, avec respectivement 20% et 50% de mortalité (**Figure 20 B**). Après induction à D8, les deux groupes Sham et SCI ont un taux de survie de 100% (**Figure 20 C**). La pneumonie à SASM a donc été induite à 3 jours post-opératoires (D3) pour l'ensemble des expériences comprenant une infection pulmonaire.

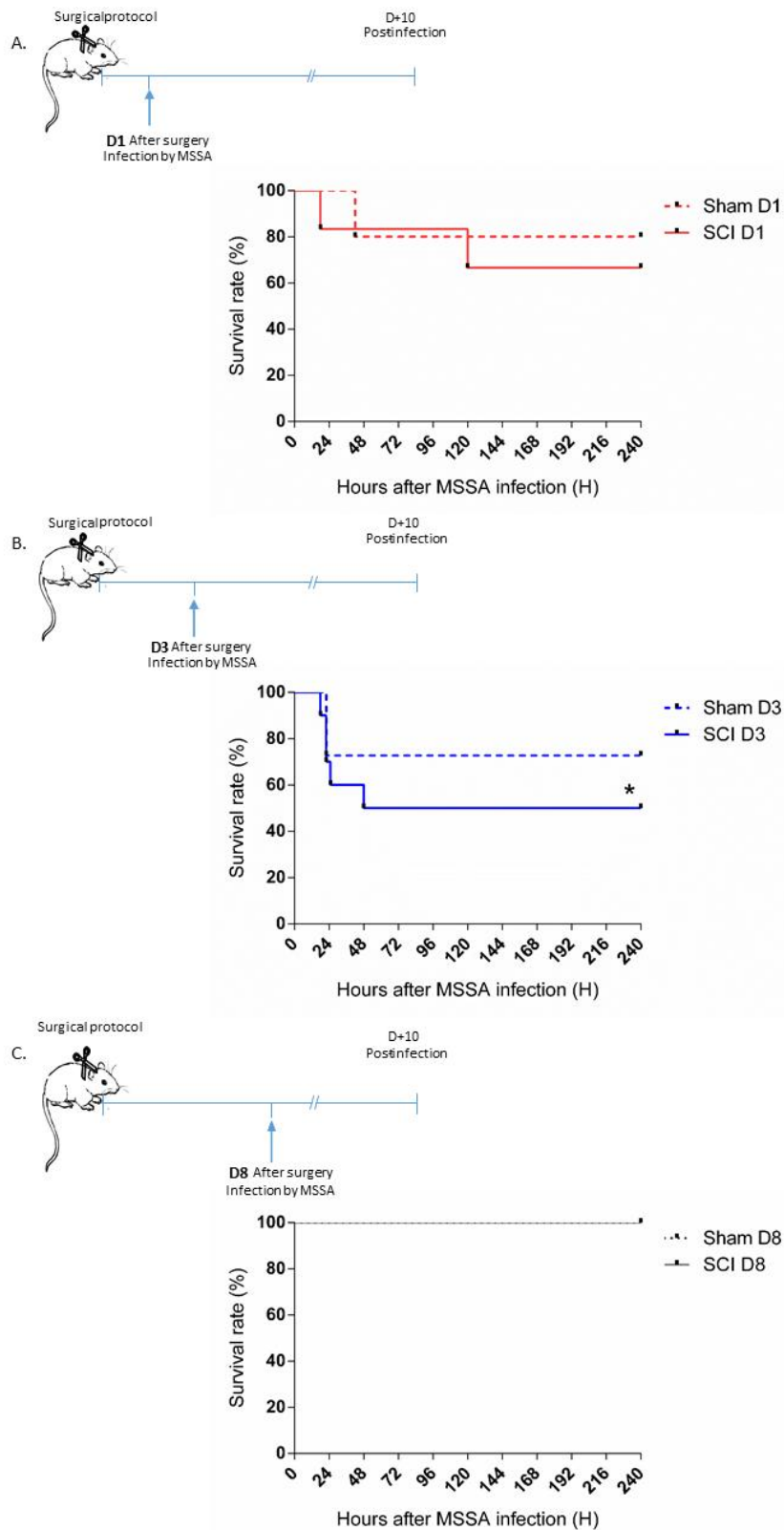


Figure 20: Survie des souris suite à une pneumonie à SASM. Survie des souris suite à une pneumonie induite à SASM à différents temps : (A) 1 jour post-opératoire (D1), (B) 3 jours post-opératoires (D3) et (C) 8 jours post-opératoires (D8). Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes, pour chaque groupe N=10. SASM (=MSSA), *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline ; SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire. (B)*p=0,04 test de Mantel-Cox.

2- Inflammation du tissu pulmonaire suite à une pneumonie à SASM avec ou sans lésion médullaire préalable

2.1 Œdème /infiltration cellulaire et charge bactérienne

Après la pneumonie, le poids des poumons augmente significativement dans les deux groupes de souris Sham et SCI, et reste élevé pendant 2 jours après l'infection (données non montrées). Des coupes histologiques de poumons de souris Sham et SCI infectées et non infectées ont été étudiées et aucune différence dans la morphologie du tissu n'a pu être observée (**Figure 21 A**). L'œdème pulmonaire et l'infiltrat cellulaire ont été quantitativement déterminés par : l'espace alvéolaire (marqueur indirect de l'aération pulmonaire), par la fonction SIOX du logiciel Fiji (Jacqueline et al. 2014). Sans infection, l'espace alvéolaire est similaire dans les deux groupes de souris, à 24 heures et 48 heures post-opératoires (**Figure 21 B**, à gauche). En revanche après l'infection, les souris SCI ont un espace alvéolaire qui diminue de manière plus précoce par rapport aux souris Sham, avec respectivement 18% [16.1%-25.2%] et 29% [28.6%-30.1%] d'espace alvéolaire à 24 heures post-infection (**Figure 21 B**, à droite). Après 48 heures post-infection, l'espace alvéolaire des deux groupes de souris est identique.

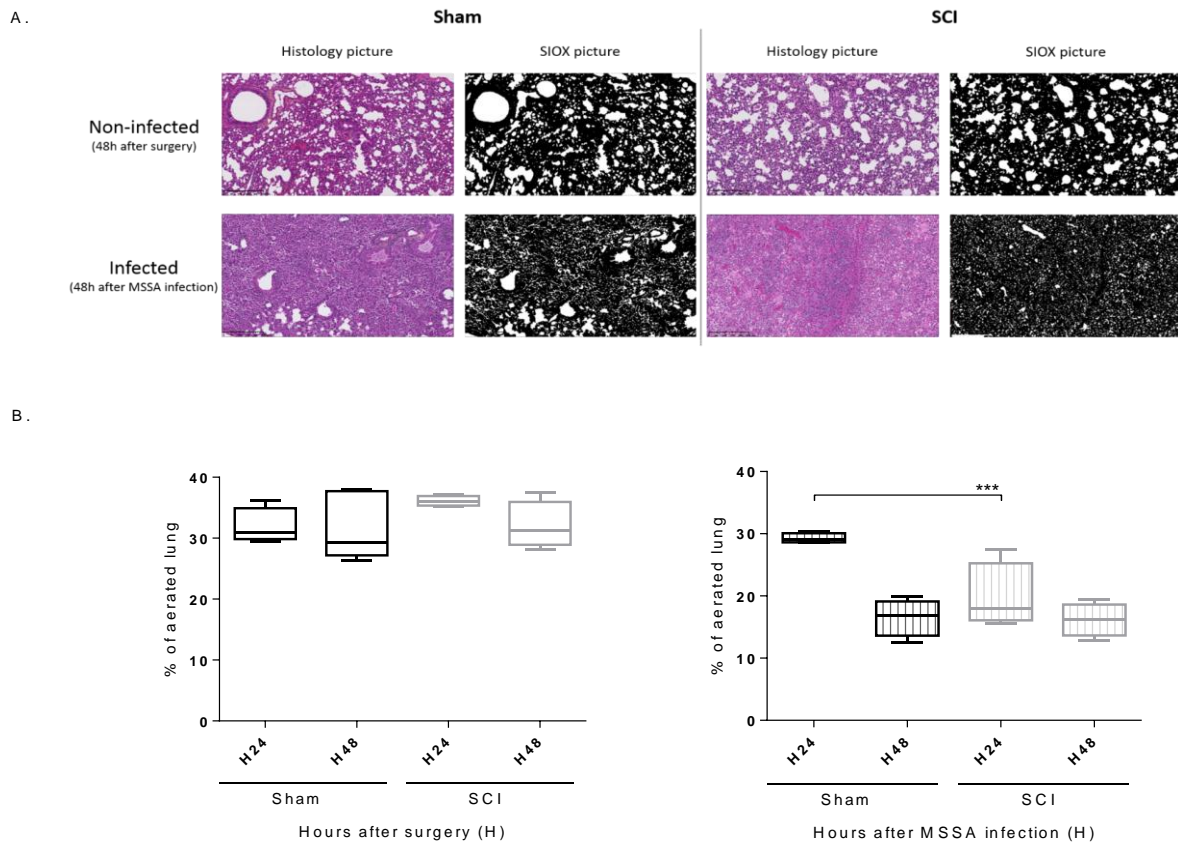


Figure 21: Présence d'un œdème et d'une infiltration cellulaire pulmonaire suite à une pneumonie à SASM au 3^{ème} jour post-opératoire, dans des souris Sham et SCI. (A) Images de sections histologiques de poumons chez des souris Sham et SCI, avant et après analyse par SIOX dans le logiciel Fiji, avec ou sans infection à SASM (10X, marquage au HPS). (B) A gauche, pourcentage d'espace alvéolaire (poumon aéré) après l'analyse par SIOX chez les souris Sham et SCI sans infection à SASM aux temps H24 et H48 post-opératoires ; A droite, pourcentage d'espace alvéolaire après l'analyse par SIOX chez les souris Sham et SCI infectées à SASM, aux temps H24 et H48 post-infection. N=8 champs par souris, avec 3 à 5 souris par temps. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. SASM (=MSSA), *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline ; SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire (B) *** $p=0,0002$ test non paramétrique de Mann-Whitney.

La charge bactérienne a été évaluée dans les poumons, suite à l'infection induite par le SASM (**Figure 22**). A 24 heures post-infection, la charge bactérienne est élevée et identique dans les deux groupes de souris Sham et SCI (**Figure 22**). Cependant, 48 heures post-infection une clairance bactérienne est observée dans les poumons des souris Sham et SCI sans différence significative entre les deux groupes.

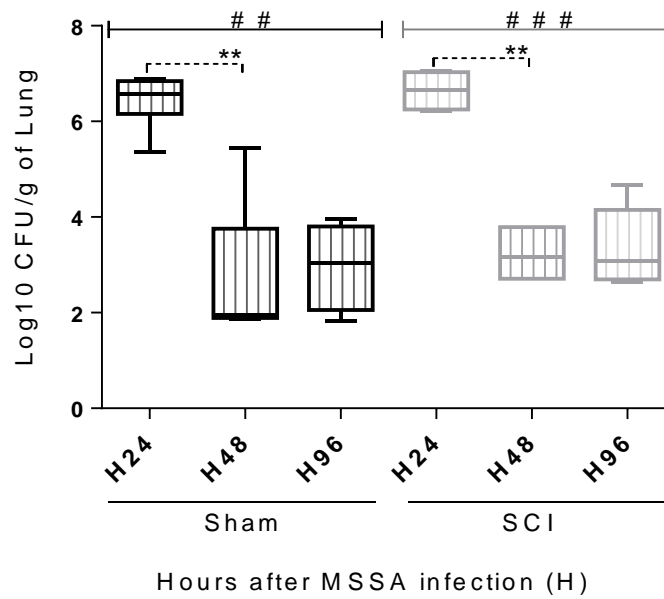


Figure 22: Charge bactérienne dans les poumons à 24h, 48h et 96h post-infection (correspondant aux temps 96 heures, 120 heures et 144 heures post-opératoire). Pour chaque groupe, N=5, sauf pour le groupe SCI au temps H48 N=3. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. SASM (=MSSA), *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline ; SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire. ##p<0,0013 & ###p=0,0006 test non paramétrique de Kruskal-Wallis ; **p<0,01 test de Post-hoc Dunn's pour la comparaison entre deux groupes intragroupe.

2.2 Augmentation de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α dans les poumons, suite à une pneumonie à SASM, 3 jours après une lésion médullaire.

La production des cytokines inflammatoires TNF- α et IL-1 β , ainsi que la molécule chimio-attractante des neutrophiles KC, ont été étudiées dans les poumons par la méthode ELISA (**Figure 23**). Pour ces trois molécules, en absence d'infection pulmonaire, leur production dans les souris Sham et SCI est sous le seuil de détection des kits ELISA (< 3 pg/mg de protéine de poumons pour TNF- α et IL-1 β , < 25 pg/mg de protéine de poumons pour KC). Six heures après l'infection à SASM, la production de TNF- α est augmentée dans les deux groupes de souris étudiés, et de manière significativement plus importante dans les poumons des souris SCI (**Figure 23 A et B**). Dans les deux groupes, la production de TNF- α diminue dès 24 heures post-infection, puis revient progressivement à un état basal, sous le seuil de détection du kit ELISA. La production d'IL-1 β et de KC est augmentée précocement

après l'infection, dans les groupes de Sham et SCI, mais il n'y a aucune différence entre les deux groupes (**Figure 23 C**). La production de TNF- α en plus grande quantité dans les souris SCI suggère une réponse inflammatoire plus importante induite par la lésion médullaire.

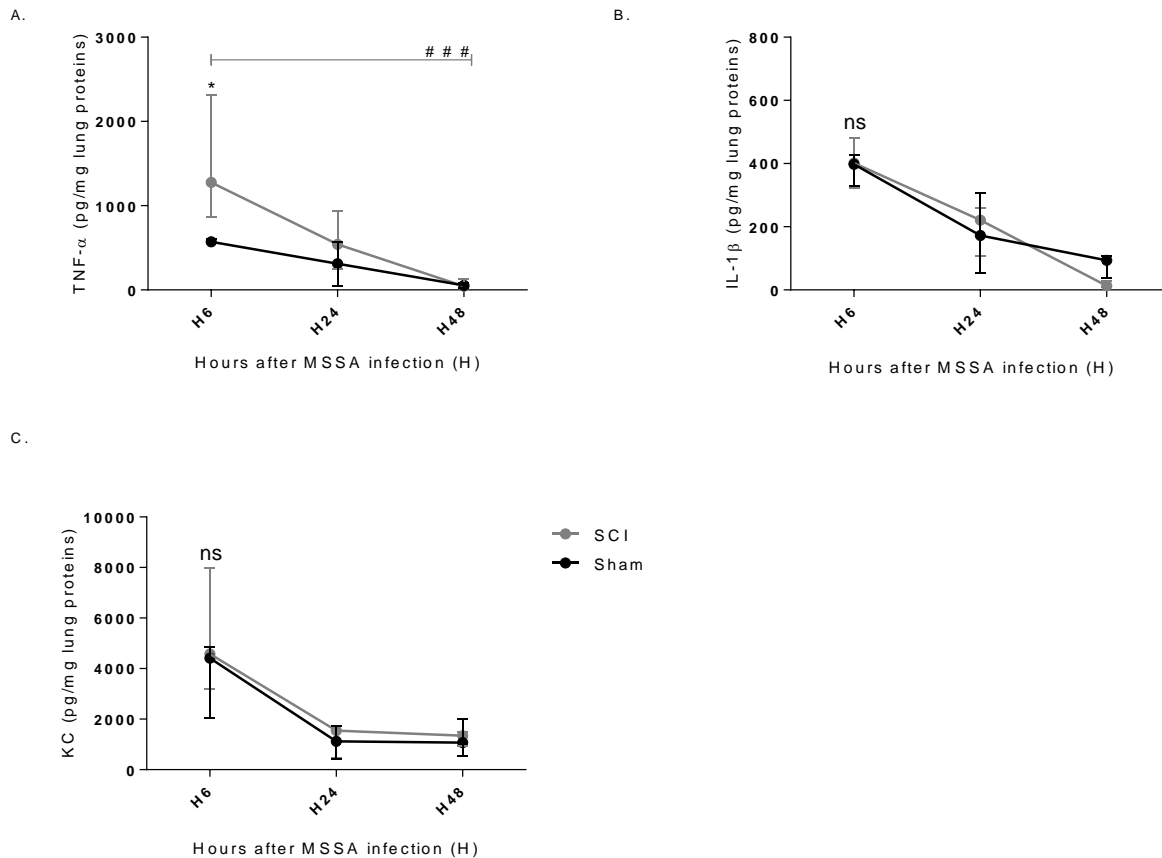


Figure 23: État inflammatoire des poumons suite à une pneumonie induite à SASM au 3^{ème} jour post-opératoire, dans les souris Sham et SCI (A) Production de TNF- α après infection à SASM (B) Production d'IL-1 β après infection à SASM (C) Production de KC après infection à SASM ; chez les souris Sham et SCI aux temps H6, H24, H48 post-opératoires. Pour chaque groupe N=5. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. ns, non significatif ; SASM (=MSSA), *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline ; SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire (A) * $p=0.0292$ test non paramétrique de Mann-Whitney ; (A) ### $p=0,0006$ chez les SCI test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

Dans cette partie nous avons observé la présence d'un traumatisme médullaire dans nos souris SCI, et validé la sensibilité à une pneumonie à SASM par :

- une surmortalité de souris SCI à une pneumonie induite à SASM 3 jours post-opératoires
- par une diminution de l'espace alvéolaire plus précoce dans les souris SCI par

rapport aux Sham

- par une augmentation de la réponse inflammatoire traduite par une surproduction de TNF- α chez les souris SCI.

Par ailleurs, la charge bactérienne ne semble pas responsable de la réponse inflammatoire exacerbée observée dans le groupe SCI par rapport au groupe Sham.

Toujours dans le but de faire un parallèle avec le scénario clinique des patients traumatisés, l'objectif a ensuite été d'évaluer la présence des deux phases de la réponse du système immunitaire consécutives à un traumatisme : 1) une phase précoce inflammatoire et 2) une phase plus tardive d'immunosuppression. Ces phases seront étudiées dans l'organe lymphoïde majeur chez la souris : la rate.

3- Réponse précoce inflammatoire suite au traumatisme médullaire

Après un traumatisme sévère, les patients présentent une phase de réponse inflammatoire exacerbée précoce nommée SIRS (Syndrome de réponse inflammatoire systémique). Pour étudier ce phénomène dans notre modèle de lésion médullaire haute, l'expression des molécules de CMH-II sur les cellules dendritiques (DC) spléniques, l'expression et la production des cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IFN- γ ont été étudiées dans la rate.

L'étude de l'expression des molécules de CMH-II sur les DC CD11c^{high}CMH-II⁺ a été effectuée par la technique de cytométrie en flux. Pour identifier ces cellules, la stratégie de gating est représentée dans la **Figure 24**.

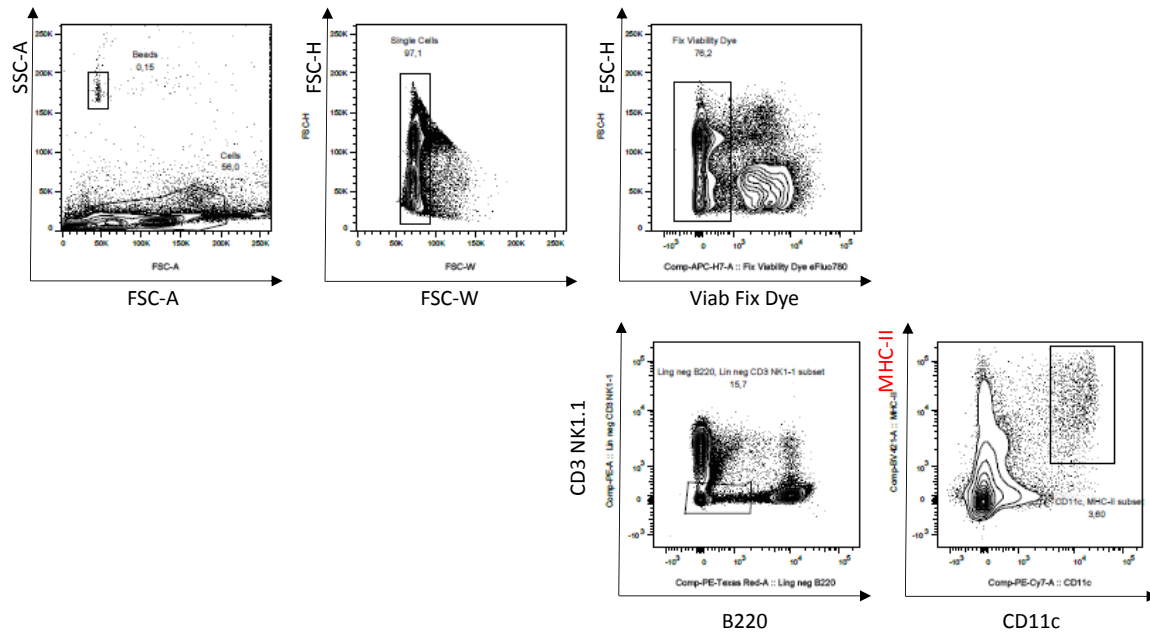


Figure 24: Stratégie de gating des cellules dendritiques (DC) spléniques $CD11c^{high}CMH-II^{+}$ par le logiciel Flow Jo. (A) De gauche à droite : Sélection des splénocytes; Sélection des cellules seules (élimination des doublets); Sélection des cellules vivantes par le marqueur de viabilité; Sélection négative des cellules dendritiques $CD3^{-}NK1.1^{-}B220^{-}$ afin d'éliminer les lymphocytes T, les cellules Natural Killer (NK) et les lymphocytes B; Sélection des DC $CD11c^{high}CMH-II^{+}$.

La formation du complexe peptide-CMH-II est augmentée suite à des stimuli inflammatoires induisant la maturation des DC (Cella et al. 1997). À 6 heures post-opératoires, l'expression membranaire des molécules du CMH-II est significativement augmentée sur les DC spléniques $CD11c^{high} MHC-II^{+}$ des souris SCI par rapport aux souris Sham, avec respectivement 29781 [25990-34614] gMFI et 17159 [12645-19625] gMFI de molécules du CMH-II (**Figure 25 A**). Le traumatisme rachidien induit donc une phase précoce inflammatoire par la surexpression des molécules du CMH-II dans les DC de la rate. Dans le but de confirmer ce résultat, l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IFN- γ a été évaluée par qRT-PCR dans les cellules spléniques $CD11c^{+}$ (**Figure 25 B et C**). Les cellules dendritiques produisent la cytokine IL-12 suite à un stress, ce qui va activer la réponse pro-inflammatoire des cellules NK par la production d'IFN- γ (Vivier and Ugolini 2009). Nos résultats confirment ce phénomène, car l'ARNm IL-12 est exprimé de manière précoce, 6 heures post-opératoires, et augmente chez les souris SCI par rapport aux souris Sham (**Figure 25 B**). Puis, il s'en suit une surexpression de l'ARNm IFN- γ chez les SCI comparées au Sham, 24 heures post-opératoires (**Figure 25 C**).

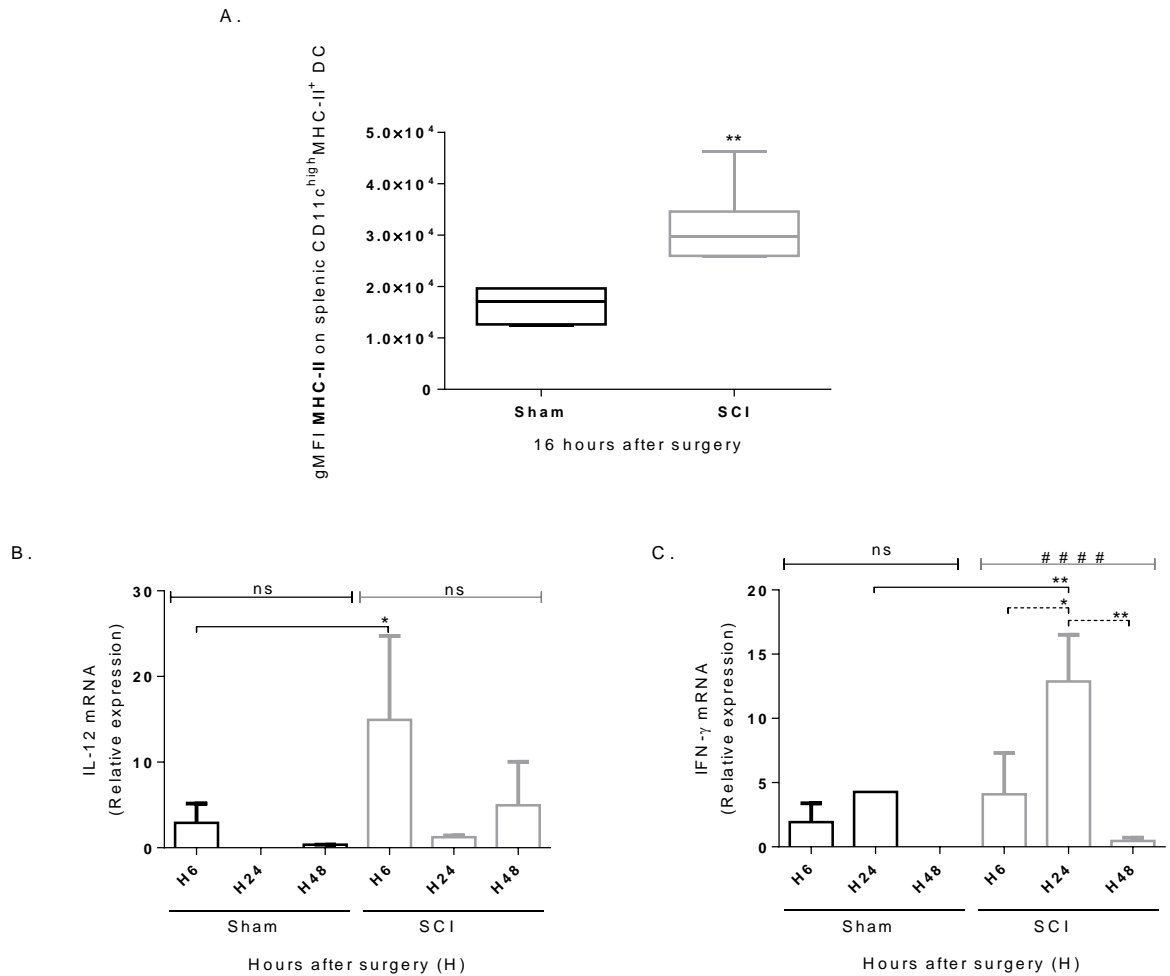


Figure 25: Phase précoce hyper-inflammatoire suite à une lésion médullaire haute. (A) Intensité moyenne de fluorescence géométrique (gMFI) des molécules du CMH-II (MHC-II) exprimées par les cellules dendritiques spléniques (DC) CD11c^{high}MHC-II⁺ chez les souris Sham et SCI, H16 post-opératoire ; pour chaque groupe N=6 (B) Expression relative d'ARNm IL-12 (C) Expression relative d'ARNm IFN-γ chez les souris Sham et SCI, à H6, H24 et H48 post-opératoire ; pour chaque groupe N=3. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire; (A) **p=0,0025 (B) *p<0,05, (C) **p=0,0095 test non paramétrique de Mann-Whitney ; (B) ns (non significatif), (C) ns (non significatif) pour le groupe Sham et #####p<0,0001 pour le groupe SCI avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (C)*p<0,05 et **p<0,01 test de Post-hoc Dunn's pour la comparaison entre deux groupes intragroupe.

Chez les patients traumatisés, après une phase de SIRS, une réponse de type CARS (Syndrome compensatoire de la réponse anti-inflammatoire) tardive correspondant à la phase d'IS se met en place. Afin de poursuivre la validation de notre modèle de traumatisme médullaire, la présence de marqueurs d'IS seront analysés, comme précédemment décrits chez des patients avec un traumatisme médullaire ou après d'autres types de traumatismes (Riegger et al. 2009; Boomer et al. 2011).

4- Réponse tardive anti-inflammatoire et mise en place d'une immunosuppression suite à la lésion médullaire

4.1 Diminution de la taille et du poids des rates, et lymphopénie des animaux lésés

Nous avons vu dans l'introduction qu'il existe une relation étroite entre le système nerveux et le système immunitaire. Suite au traumatisme médullaire, une importante diminution de la taille des rates des souris SCI est observée par rapport aux souris Sham (**Figure 26**).

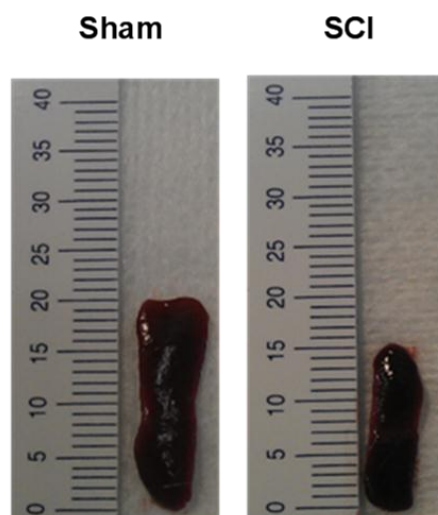


Figure 26: Images de taille des rates en mm chez des souris Sham et SCI, 72h post-opératoires. SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire.

Le poids des rates des souris Sham reste stable, contrairement au poids des rates des souris SCI qui diminue significativement au cours du temps, avec un poids de 109,4 [92,3-1127,2] mg à 24 heures post-opératoires, et de 50,3 [42,0-61,8] mg à 96 heures post-opératoires (**Figure 27 A**). La perte de poids et de taille des rates, suite au traumatisme médullaire, est associée à la présence d'une lymphopénie des lymphocytes T CD3⁺, qui ne débute que 24 heures post-opératoires (données non montrées). À 72 heures post-opératoires, il y a une diminution importante du nombre de lymphocytes T CD3⁺ spléniques dans les souris SCI comparées aux souris Sham, avec respectivement 2,03 x10⁶ [1,04x10⁶-2,5610⁶] et 6,76x10⁶ [4,47x10⁶-7,96x10⁶] lymphocytes T CD3⁺ (**Figure 27 B**).

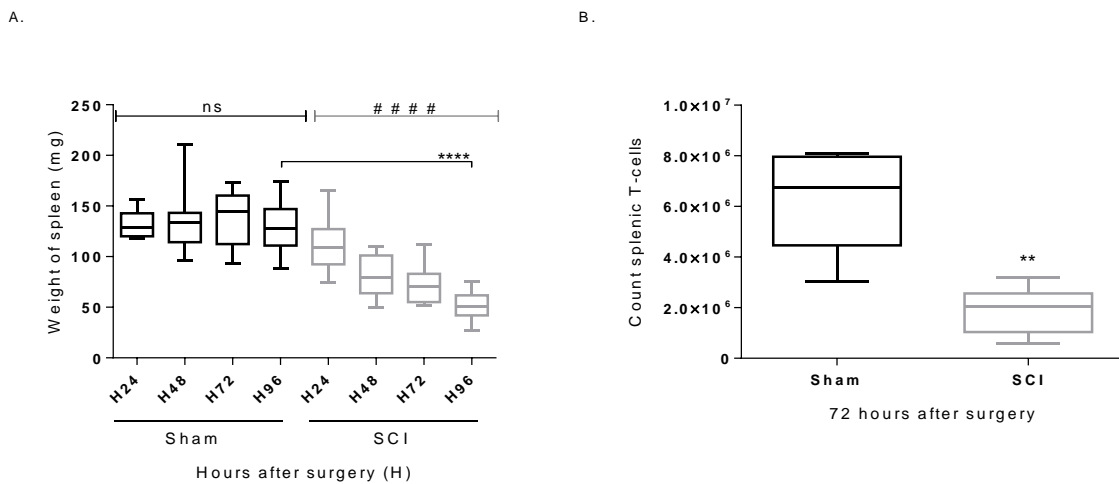


Figure 27: Immunosuppression chez les souris SCI suite au traumatisme. (A) Poids des rates après le protocole chirurgical des souris Sham et SCI, à 24H, 48H, 72H et 96H post-opératoires ; chaque groupe N=10 (B) Nombre de lymphocytes T spléniques CD3⁺ viables, 72h post-opératoires sans infection dans les souris Sham et SCI ; chaque groupe N=6. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire; (A) ****p<0,0001 et (B) **p=0,0043 test non paramétrique de Mann-Whitney ; (A) ns (non significatif) pour le groupe Sham et #####p<0,0001 pour le groupe SCI avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

4.2 Augmentation de la cytokine anti-inflammatoire IL-10

Une augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est un marqueur de la phase immunosuppressive, retrouvée chez des patients atteints d'AVC ischémique (Chamorro, Urra, and Planas 2007), ou encore chez des patients après un traumatisme crânien (Woiciechowsky et al. 1998 ; Chenouard et al. 2015) et dans des modèles murins de choc hémorragique (Roquilly et al. 2013). La mise en place « tardive » de l'IS est suggérée par une augmentation significative de l'expression d'ARNm IL-10 par rapport aux souris Sham, 48 heures post-opératoires (**Figure 28 A**), ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-10 chez les souris SCI comparées aux souris Sham, avec respectivement 323,6 pg/mg [248,8-378,6 pg/mg] et 161,3 pg/mg [132,2-183,4 pg/mg], au même temps (**Figure 28 B**).

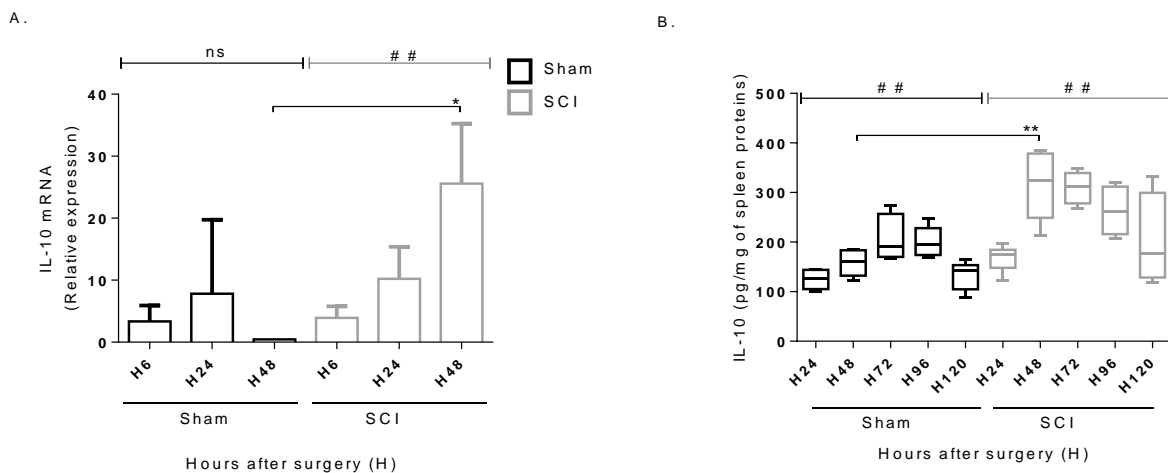


Figure 28: Expression et production de la cytokine IL-10 dans les rates des souris Sham et SCI. (A) Expression relative d'ARNm IL-10 dans les splénocytes CD11c⁺ aux temps H6, H24 et H48 post-opératoires des souris Sham et SCI ; chaque groupe N=3 (B) Production d'IL-10 dans la rate aux temps H24, H48, H72, H96 et H120 post-opératoires des souris Sham et SCI ; chaque groupe N=6. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire ; (A) *p=0,0286 (B) **p=0,0022 test non paramétrique de Mann-Whitney. (A) ns (non significatif) pour le groupe Sham et ##p=0,0012 pour le groupe SCI (B) ##p=0,0011 pour le groupe Sham et ##p=0,0066 pour le groupe SCI avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

4.3 Diminution de la production de TNF- α après stimulation *ex vivo* par du LPS de cultures de sang total

Après un stress aigu de l'organisme, il est admis qu'une hyporéactivité cellulaire après stimulation par du LPS de culture de sang total est le signe d'une IS (Asehnoune et al. 2006). Afin de démontrer l'existence d'une immunodépression post-traumatique, un dosage du taux de TNF- α sur des cultures de sang total avec ou sans stimulation par du LPS a été réalisé par méthode ELISA. Après stimulation, la production de TNF- α est fortement augmentée dans le groupe Sham avec 738 ng/mL [654,8-1199 ng/mL], 48 heures post-opératoires. Mais le niveau d'induction de TNF- α est significativement plus faible dans le groupe SCI avec une diminution de production : 451,6 ng/mL [206,9-623,8 ng/mL], 48 heures post-opératoires dans le groupe SCI (**Figure 29**).

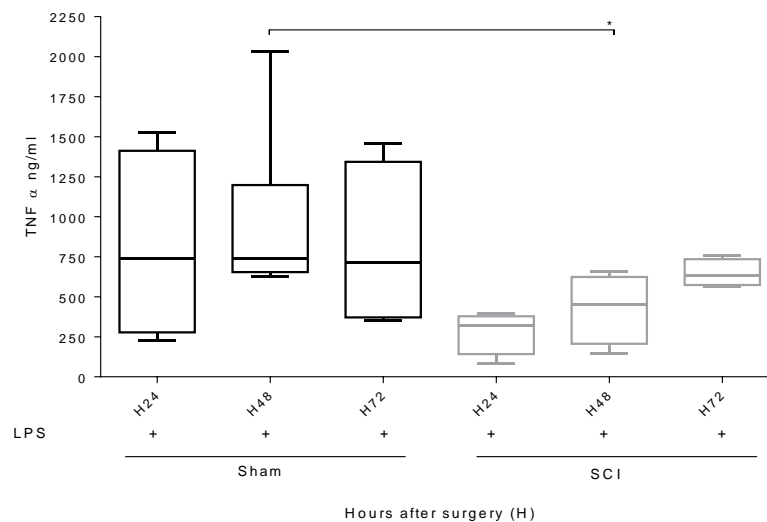


Figure 29: Diminution de production du TNF- α après stimulation par du LPS chez les souris SCI suite au traumatisme. Production de TNF- α après une stimulation de cultures de sang total par du LPS durant 24 heures *ex-vivo*, dans les souris Sham et SCI, aux temps 24H, 48H et 72H post-opératoires ; chaque groupe N=4. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire; * $p=0,019$ test non paramétrique de Mann-Whitney.

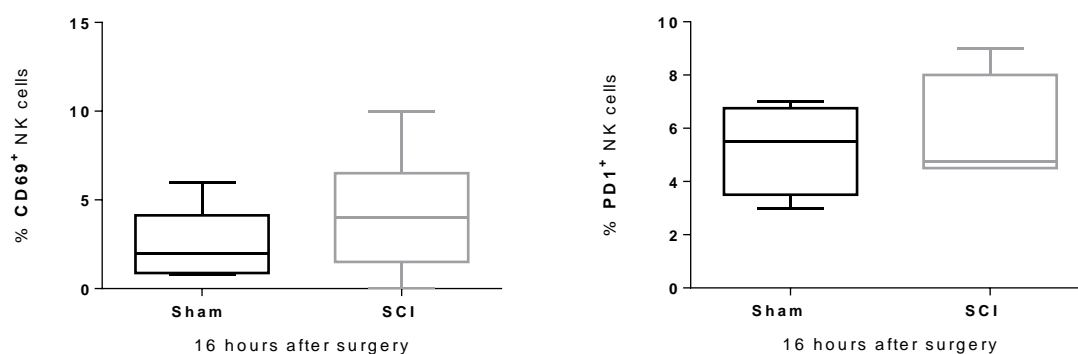
4.4 Epuisement lymphocytaire et surexpression de PD-1 sur les lymphocytes T spléniques après une lésion médullaire.

L'expression de molécules marqueurs d'épuisement lymphocytaire T a été très peu étudiée dans le contexte du traumatisme médullaire. L'épuisement lymphocytaire a un rôle essentiel dans la mise en place de l'IS. Dans le but d'évaluer le niveau d'épuisement cellulaire dans le modèle SCI, les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T (LT ou T-cells) et les cellules Natural Killer (NK) ont été étudiés, 16h post-opératoires. Nous nous sommes intéressés à l'état de maturation (expression de KLRG1) et d'activation (expression de CD69) des cellules, et également aux marqueurs d'épuisement cellulaire tels que PD-1, PDL-1 et CTLA-4. Le phénotype utilisé pour identifier les 3 groupes de cellules d'intérêt a été le suivant : $CD3^-NKp46^-CD11c^+CD8^-$ pour les DC, $CD3^-NKp46^+CD11c^+$ pour les NK, et $CD3^+NKp46^-$ pour les LT. Pour les DC, aucune différence n'est observée dans le pourcentage de DC, ni dans le nombre de DC, ni dans l'expression des récepteurs CD80, CD86 et PD-L1 entre le groupe Sham et SCI (données non montrées). Pour les cellules NK, aucune différence significative n'est observée entre le groupe Sham et SCI au niveau du pourcentage de NK dans la rate, mais aussi au niveau de l'expression des molécules KLRG-1 (données non montrées), CD69 et PD-1 (**Figure 30 A**).

Concernant les lymphocytes T, il n'y a aucune différence ni de pourcentage des LT, ni dans l'expression de la molécule KLRG1 entre les groupes Sham et SCI (données non montrées). En revanche, l'expression de CD69 (marqueur d'activation) sur les lymphocytes T spléniques est augmentée dans les souris SCI par rapport aux souris Sham, avec respectivement 3,8% [3,2-5,4%] de LT $CD69^+$ contre 2,5% [2,0-3,0%] de LT $CD69^+$ (**Figure 30 B**, graphe central droit). Comme dans l'article de Zha et al sur un modèle SCI thoracique chronique (Zha et al. 2014), l'expression de PD-1 est significativement augmentée sur les lymphocytes T du groupe SCI avec 8,0% [7,5-13,0%] de LT $PD-1^+$, par rapport aux souris Sham avec 3,5% [2,8-6,0%] de LT $PD-1^+$ (**Figure 30 B**, graphe de droite).

La surexpression de PD-1 sur les lymphocytes T spléniques des souris SCI, laisse supposer un état d'épuisement lymphocytaire T. Ce phénomène est très étudié dans les infections chroniques notamment virales et en cancérologie, mais très peu en traumatologie. Nous nous sommes intéressés aux effets de l'immunothérapie par l'anticorps anti-PD1 dans le modèle de traumatisme médullaire compte tenu de la surexpression de PD-1 à la membrane des lymphocytes T après un traumatisme médullaire.

A. Natural Killer cells (NK)



B. T lymphocytes cells (T-cells)

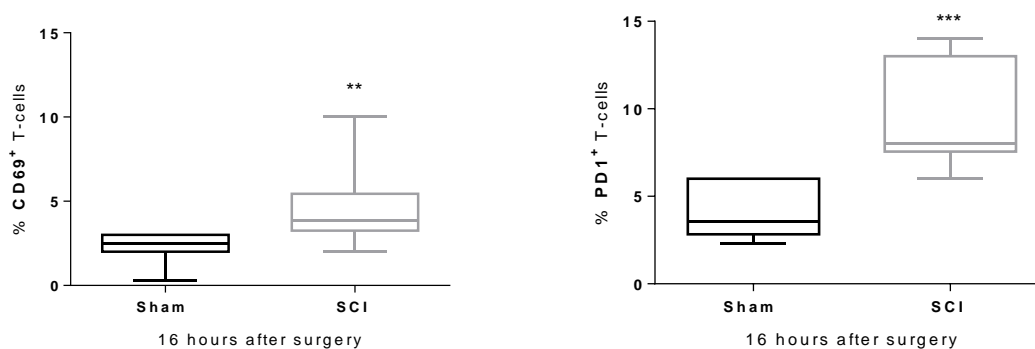


Figure 30: Expression de marqueurs membranaires de surface sur les cellules Natural Killer (NK) CD3⁻NKp46⁺ et les lymphocytes T (T-cells ou LT) CD3⁺NKp46⁻ spléniques, 16 heures post-opératoires dans les souris Sham et SCI. (A) A gauche, pourcentage de cellules NK qui expriment CD69 ; A droite, pourcentage de cellules NK qui expriment PD1 dans les souris Sham et SCI. (B) A gauche, pourcentage de LT qui expriment CD69 ; A droite, pourcentage de LT qui expriment PD1, dans les souris Sham et SCI. N=6 ou 9 dans le groupe Sham, et N=9 ou 12 dans le groupe SCI. SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire. (B) A gauche ** $p < 0,0013$ CD69, A droite *** $p < 0,0010$ PD1 test non paramétrique de Mann-Whitney.

5- Marqueurs d'immunosuppression chez les souris SCI après une pneumonie à SASM

5.1 Balance IFN- γ et IL-10 après une lésion médullaire suivi d'une pneumonie à SASM

Après avoir identifié que le traumatisme à lui seul engendrait une IS, nous nous sommes intéressés aux modifications que pouvaient procurer cette IS sur une pneumonie à SASM ultérieure. La production des cytokines IL-10 et IFN- γ ont été analysées après une pneumonie à SASM (**Figure 31** A et B). Après l'infection au 3^{ième} jour post-opératoire, la production d'IL-10 augmente significativement dans les souris SCI par rapport aux souris Sham dès 6 heures post-infection, avec respectivement 234,6 pg/mg [104,3-352,4 pg/mg] et 142,6pg/mg [138,6-165,6 pg/mg] (**Figure 31** A). La production d'IL-10 reste élevée 48 heures après l'infection chez les souris SCI avec 226,6 pg/mg [220,5-229,3 pg/mg], contrairement aux souris Sham avec 137,4 pg/mg [119,4-145,7 pg/mg]. En revanche, la production d'IFN- γ est significativement plus élevée, suite à la pneumonie à SASM, dans les souris Sham par rapport aux souris SCI à 48 heures post-infection, avec respectivement 16,71pg/mg [10,11-37,18pg/mg] contre 3,43pg/mg [3,22-3,65pg/mg] (**Figure 31** B). Ces deux derniers graphes montrent une balance d'expression cytokinique pro-inflammatoire dans le groupe Sham, et anti-inflammatoire dans le groupe SCI.

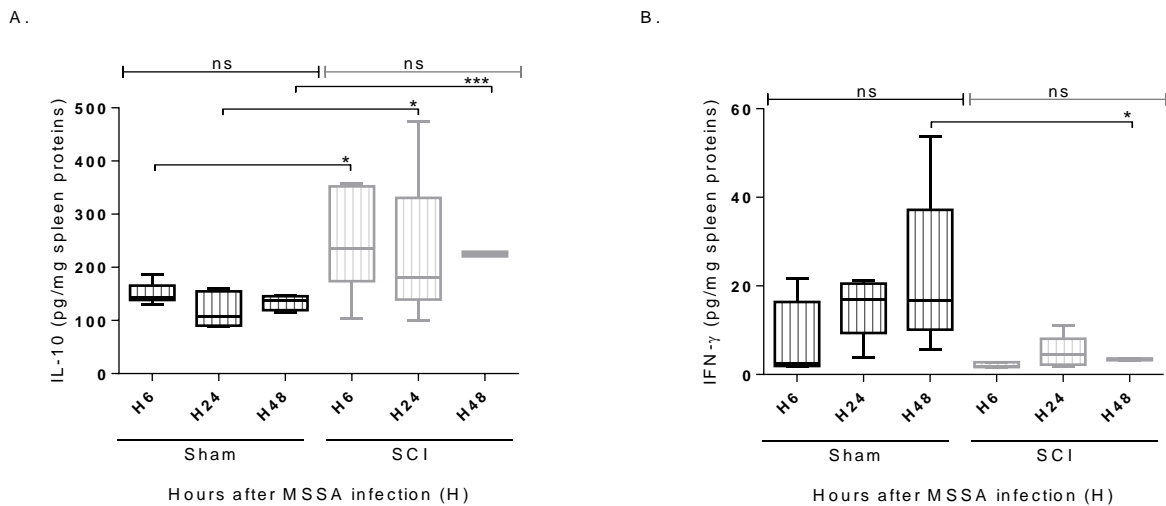


Figure 31: Immunosuppression chez les souris SCI suite à une pneumonie à SASM. (A) production d'IL-10 dans la rate des souris Sham et SCI suite à une pneumonie à SASM à 6 heures, 24 heures et 48 heures post-infection (correspondant respectivement à H78, H96 et H120 post-opératoires)); chaque groupe N=6 (B) production d'IFN- γ dans la rate des souris Sham et SCI suite à une pneumonie à SASM, à H78, H96 et H120 post-opératoires (correspondant respectivement à 6 heures, 24 heures et 48 heures post-infection); chaque groupe N=6. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. SASM (=MSSA), *Staphylococcus aureus* sensible à la métricilline ; SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire; (A) * $p=0,0252$ et *** $p=0,0007$; (B) * $p=0,0159$ test non paramétrique de Mann-Whitney ; (A), (B) ns (non significatif) avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

5.2 Diminution de l'expression du CMH-II après une lésion médullaire et une pneumonie à SASM

L'IS est également caractérisée par une diminution de la capacité à présenter l'antigène via une diminution d'expression des molécules du CMH-II à la surface des monocytes dans le sang périphérique de patients atteints de traumatismes médullaires (Riegger et al. 2009), ou de traumatisme crânien (Roquilly et al. 2017), ou atteints de sepsis (Boomer et al. 2011). Ce phénomène est aussi retrouvé dans des modèles souris de choc hémorragique ou de traumatisme médullaire (Roquilly et al. 2010 ; Riegger et al. 2007). L'IS par la diminution de l'expression du CMH-II sur les DC CD11c^{high}MHC-II⁺ spléniques n'est visible qu'après une infection par SASM, dans les souris SCI par rapport aux souris Sham à 24 heures post-infection, avec respectivement 10918 [8208-15425] gMFI contre 18687 [17460-20698] gMFI (**Figure 32**).

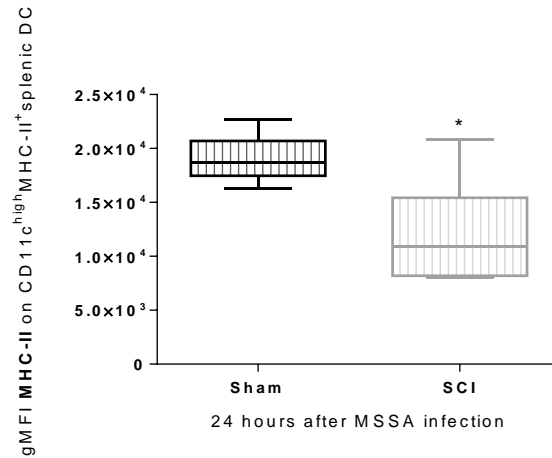


Figure 32: Expression des molécules du CMH-II à la membrane des cellules dendritiques spléniques chez les souris SCI suite à une pneumonie à SASM. Intensité moyenne de fluorescence géométrique (gMFI) des molécules du CMH-II (=MHC-II) sur les cellules dendritiques spléniques (DC) CD11c^{high}MHC-II⁺ des souris Sham et SCI, 24 heures post-infection (correspondant à 96 heures post-opératoires; pour chaque groupe N=6 Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. SASM (=MSSA), *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline ; SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; Sham, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale sans lésion médullaire; (C)*p=0,035 test non paramétrique de Mann-Whitney ; (C) ns (non significatif) avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis

6- L'immunothérapie par un anticorps anti-PD1 dans le modèle de traumatisme médullaire

Cette immunothérapie par anti-PD-1 a pour but de rétablir l'activation du système immunitaire, et ainsi de diminuer la survenue d'infections lors de l'IS, suite à un traumatisme sévère. Cette immunothérapie a été testée sur notre modèle de souris SCI.

6.1 Effet dose de l'immunothérapie par l'anticorps anti-PD1

L'immunothérapie par un anticorps anti-PD1 a déjà été étudiée dans des modèles de sepsis ou de lésion médullaire chronique (Zha et al. 2014), mais jamais dans un modèle de lésion médullaire aiguë pour diminuer l'IS post-traumatique et les conséquences des infections bactériennes secondaires. Le traitement par l'anticorps anti-PD-1 (**Figure 33**), ou par son anticorps isotype contrôle, a été effectué avec deux doses distinctes : 10mg/kg de façon similaire aux articles utilisant des modèles de sepsis (Brahmamdham et al. 2010, Chang et al. 2013); ou à une dose de 0,2mg/kg, proche de la dose efficace la plus faible testée en cancérologie (Topalian et al. 2012).

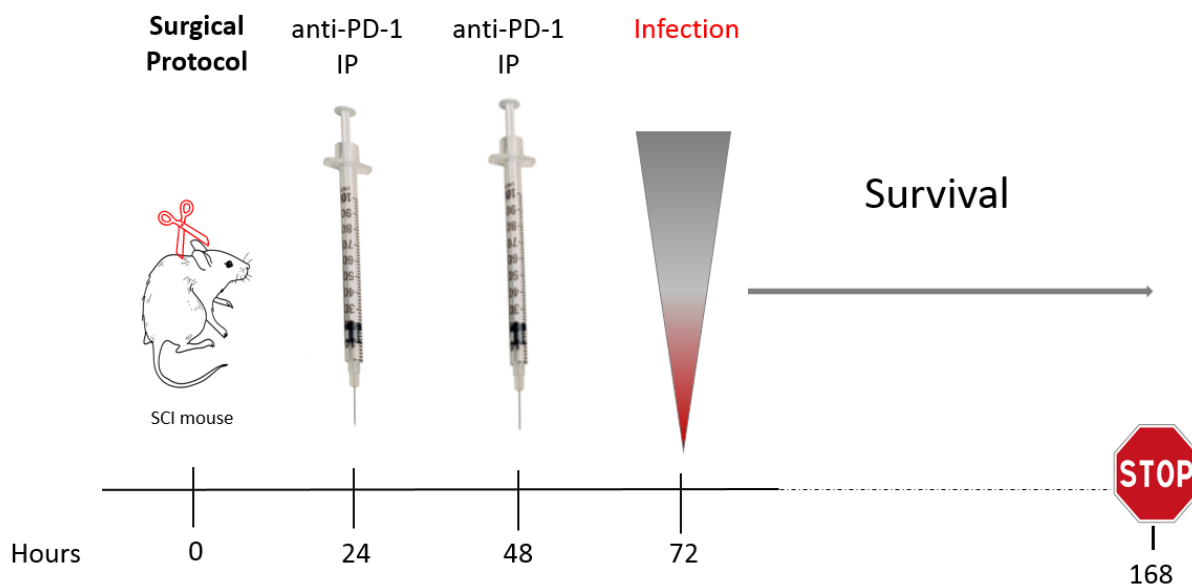
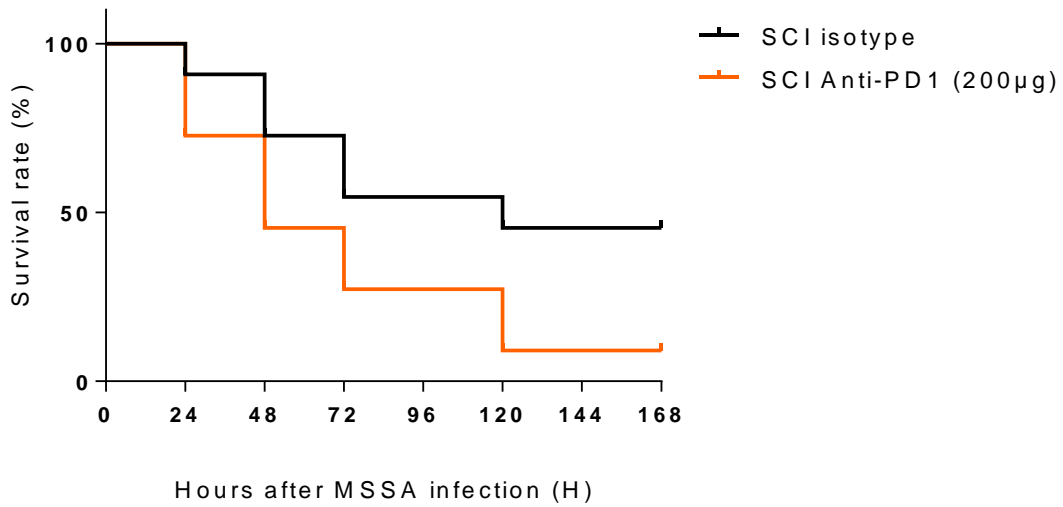


Figure 33: Protocole d'immunothérapie par l'anticorps anti-PD-1. Mise en place du protocole chirurgical à H0 ; une injection par jour d'anti-PD1 ou isotype contrôle en IP à 24h et à 48h post-opératoires, suivi d'une pneumonie induite à SASM à 72h post-opératoires. Les souris sont suivies 7 jours (= 168h post-opératoire) suite à l'infection. IP, intrapéritonéal ; SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire.

La survie des souris SCI traitées par un anticorps anti-PD-1 (SCI anti-PD1), ou traitées par l'anticorps isotype contrôle (SCI isotype), a été étudiée sur 7 jours (168 heures) suite à la pneumonie induite à SASM (**Figure 34**). Avec une dose d'anticorps de 10mg/kg (200µg par souris) (Brahmamdam et al. 2010, Chang et al. 2013), la mortalité des souris SCI avec l'anti-PD1 est plus élevée avec 9,1% des souris qui ont survécu à l'infection à SAMS, alors qu'avec l'anticorps isotype contrôle, 45,4% des souris ont survécu (**Figure 34 A**). L'anticorps anti-PD-1 à forte dose montre un effet délétère sur la survie des souris SCI. Une dose cinquante fois plus faible d'anticorps anti-PD1 (0,2mg/kg, 4µg par souris) a été testée. Avec cette plus faible dose, l'anticorps anti-PD-1 a une action significativement bénéfique sur la survie des souris SCI suite à la pneumonie à SASM avec 83,3% de souris anti-PD-1 vivantes pendant les six premiers jours, contre seulement 46,7% de survie chez les souris isotype contrôle (**Figure 34 B**).

A.



B.

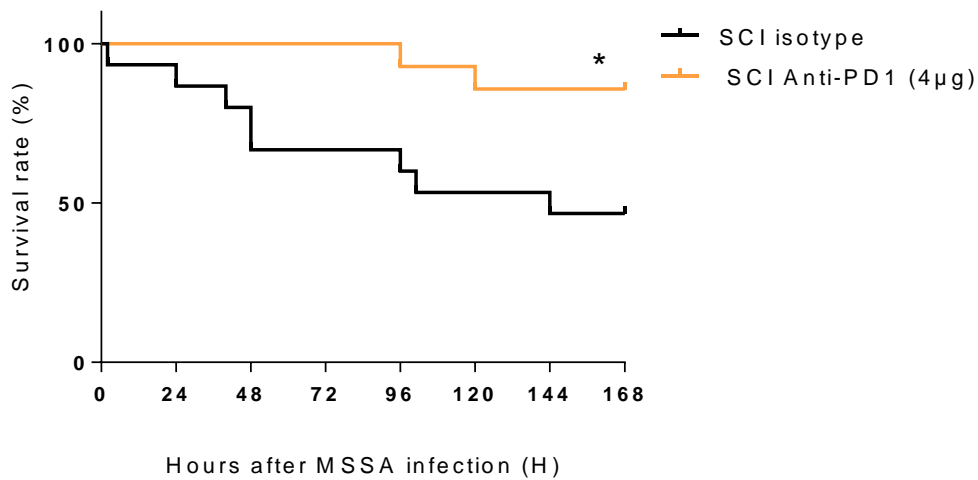


Figure 34: Survie des souris SCI traitées par anticorps anti-PD1, ou par un anticorps isotype contrôle, suite à la pneumonie à SASM (A) survie des souris avec un traitement par anticorps à la dose de 10mg/kg (correspondant à 200µg/souris) (B) Survie des souris SCI survie des souris avec un traitement par anticorps à la dose de 0,2mg/kg (correspondant à 4µg/souris) Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes, pour chaque groupe N=8. SASM (=MSSA), Staphylococcus aureus sensible à la méticilline ; SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire ; (A) $p=0,0619$ (B) $*p=0,0220$ test de Mantel-Cox.

6.2 L'anticorps anti-PD1 augmente la population des lymphocytes NKT spléniques et la production d'IFN- γ par les NKT chez les souris SCI

Nous avons voulu tester l'effet de l'immunothérapie par l'anticorps anti-PD1 sur les cellules spléniques et sur la réversibilité de l'épuisement lymphocytaire. Dans le modèle de sepsis de Brahmamdam et collaborateurs., l'administration de l'anticorps anti-PD-1 a pour effet d'augmenter le nombre des splénocytes dont les lymphocytes T (LT) CD4⁺ et CD8⁺, les lymphocytes B, les cellules NK et les cellules dendritiques (Brahmamdam et al. 2010).

Nous nous sommes intéressés au pourcentage et au nombre des différentes cellules spléniques suivantes : lymphocytes T (CD3⁺NK1.1⁻) CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ et CD4⁺CD8⁺; les lymphocytes NKT (CD3⁺NK1.1⁺) CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ et CD4⁺CD8⁺; et les cellules NK (CD3⁻NK1.1⁺) (**Figure 35**).

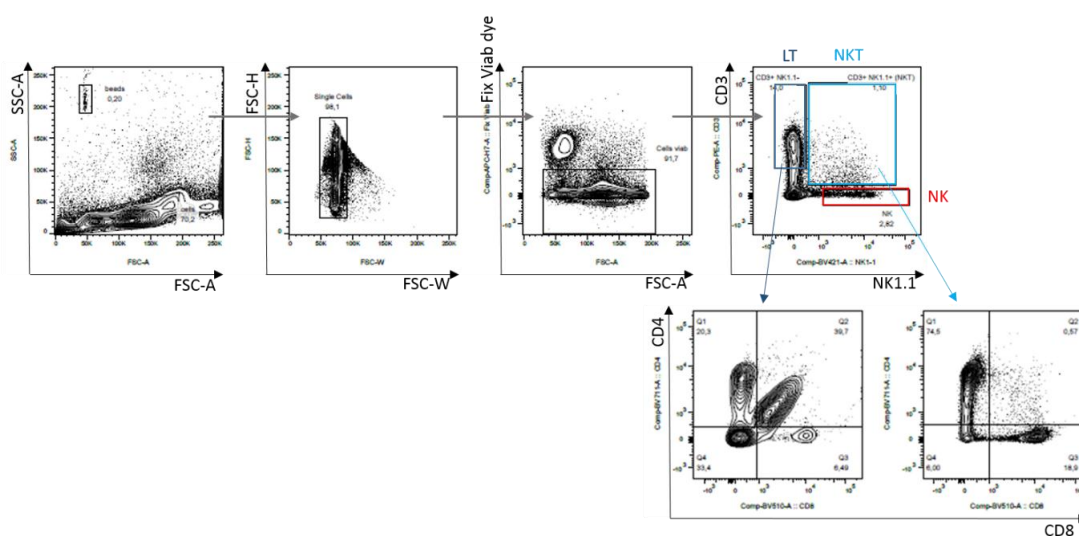


Figure 35: Stratégie de gating des cellules lymphocytes T, des NKT et des cellules NK spléniques. Gating de gauche à droite: cellules spléniques, cellules seules, cellules viables, populations des lymphocytes T/NKT/NK, sous-population en CD4/CD8 des LT à gauche et des NKT à droite.

Suite au traitement par l'anticorps anti-PD1 (4µg/souris), seuls les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules NKT CD8⁺ augmentent en pourcentage (**Figure 36 A et B, Figure 37**). Les souris SCI anti-PD-1 ont une augmentation significativement plus importante de lymphocytes T CD4⁺ avec 72,4% [71,0%-74,4%] de LT CD4⁺ spléniques contre 67,2% [65,1%-70,5%] de LT CD4⁺ dans les souris isotype (**Figure 36 A**). En comparant les deux groupes de souris SCI anti-PD-1 et isotype, le pourcentage des cellules NKT CD8⁺ spléniques augmente de manière significative chez les souris anti-PD-1 avec 13,1% [10,5%-17,6%] de NKT CD8⁺ contre 7,39% [3,62%-9,75%] de NKT CD8⁺ chez les souris isotype, **p=0.0093 (**Figure 36 B**). De plus, les cellules NKT produisent de manière significative plus d'IFN-γ chez les souris SCI traitées par anti-PD1 avec 16,3% [15,1%-17,4%] de cellules produisant de l'IFN-γ, contre 10,8% [9,4%-13,4%] pour les NKT spléniques des souris SCI isotype (**Figure 36 C**). Les cellules NKT CD8⁺ ont tendance à produire plus d'IFN-γ chez les souris traitées par anticorps bloquant anti-PD-1 par rapport aux souris isotype contrôle (**Figure 36 D**).

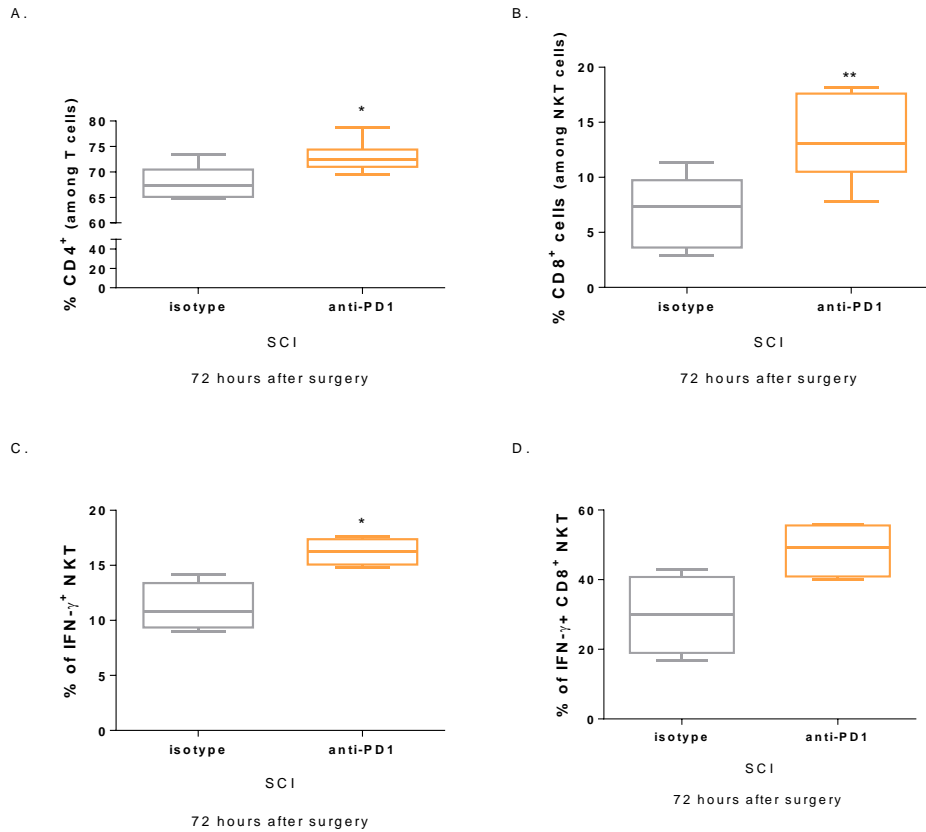


Figure 36 : Effet de l'immunothérapie anti-PD1 sur les cellules spléniques et sur l'épuisement lymphocytaire, 72 heures post-opératoires. (A) Pourcentage des cellules spléniques lymphocytes T (LT) CD4⁺ viables ; (B) Pourcentage des cellules spléniques NKT CD8⁺ viables, dans les souris SCI traitées par l'anticorps anti-PD-1 ou l'isotype contrôle (4 μ g/souris), 72 heures post-opératoires. (C) Pourcentage de cellules NKT vivantes produisant de l'IFN- γ (D) Pourcentage de cellules NKT CD8⁺ vivantes produisant de l'IFN- γ , dans les souris SCI traitées par l'anticorps anti-PD1 ou l'isotype contrôle (4 μ g/souris), 72 heures post-opératoires. Dans chaque groupe N=3. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire. (A) * $p=0,0245$ (B) ** $p=0,0093$ (C) * $p=0,028$ et (D) $p=0,057$ avec le test non paramétrique de Mann Whitney.

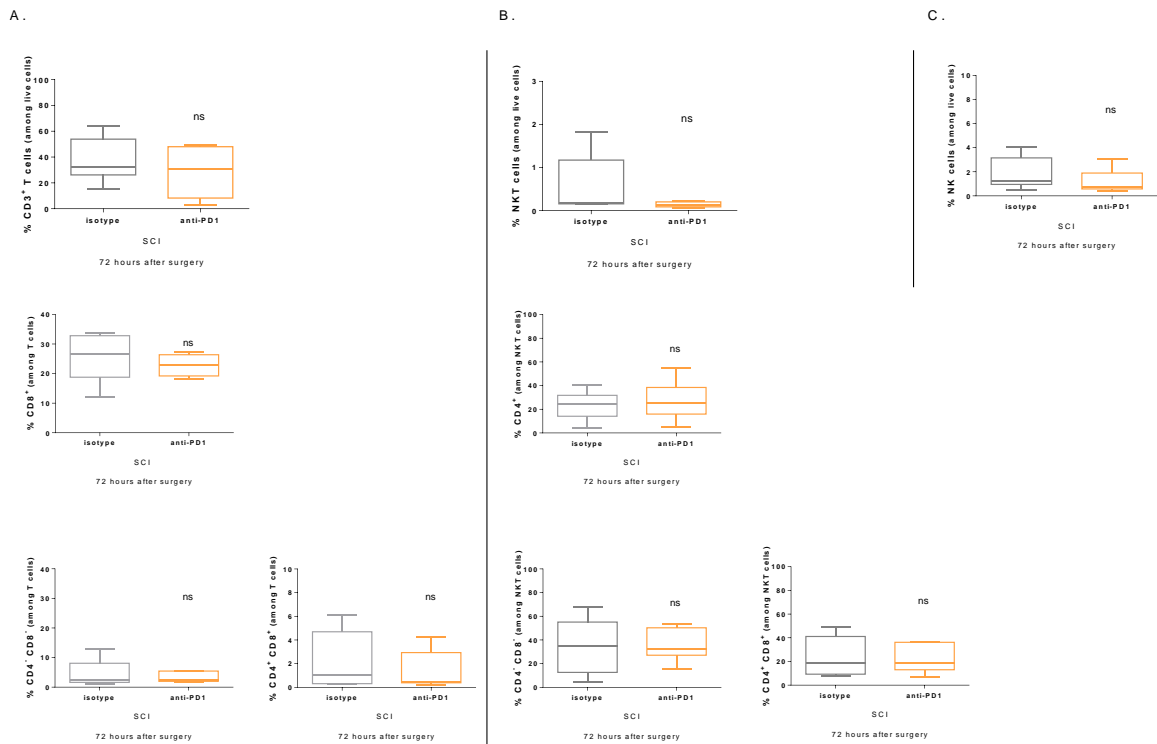


Figure 37: Pourcentage des populations spléniques de lymphocytes T (T-cells), NKT et NK chez les souris SCI traitées par l'anticorps anti-PD-1 ou par l'isotype contrôle, 72 heures post-opératoires. (A) En haut, pourcentage de lymphocytes T (T) CD3⁺ NK1.1⁻ viables ; au milieu, pourcentage de lymphocytes T CD8⁺ CD4⁻ parmi les T viables ; en bas à gauche, pourcentage de lymphocytes T CD4⁻ CD8⁻ parmi les T viables ; en bas à droite, pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ CD8⁺ parmi les T viables, dans les souris SCI anti-PD-1 ou isotype. (B) En haut, pourcentage de lymphocytes NKT CD3⁺ NK1.1⁺ viable ; au milieu, pourcentage de NKT CD4⁺ CD8⁻ parmi les NKT viables ; en bas à gauche pourcentage de NKT CD4⁻ CD8⁻ parmi les NKT viables ; en bas à droite pourcentage de NKT CD4⁺ CD8⁺ parmi les NKT viables, dans les souris SCI anti-PD-1 ou isotype. (C) Pourcentage de cellules NK CD3⁺ NK1.1⁺ viables dans les souris SCI anti-PD-1 ou isotype. Chaque groupe d'étude N=6. Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes. SCI, souris anesthésiée ayant eu la procédure chirurgicale et la lésion médullaire. Ns : non significatif

Discussion

DISCUSSION

L'objectif de ce travail a été de décrire et de valider un modèle de traumatisme médullaire comportant un syndrome d'immunosuppression (SCI-IDS) suivi d'une pneumonie à *Staphylococcus aureus*, mimant ainsi le scénario observé en clinique. Nous avons dans un premier temps validé notre modèle de souris de lésion médullaire. Les résultats obtenus dans ce modèle montrent d'une part une sensibilité plus importante des animaux à une pneumonie à SASM et d'autre part une SCI-IDS caractérisée par :

- une lymphopénie en lymphocytes T (CD3⁺)
- une diminution de l'expression des molécules du CMH-II sur les cellules dendritiques spléniques
- une diminution de production du TNF- α suite à la stimulation de cultures de sang total par du LPS
- une augmentation de la production de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire),
- une augmentation d'expression de PD-1 (marqueur de l'épuisement lymphocytaire).

Dans un second temps, nous avons montré l'efficacité du traitement par anticorps anti-PD-1 sur la survie des souris avec une lésion médullaire suivie par une pneumonie à SASM. Le blocage de la co-stimulation négative du récepteur PD-1 entraîne un effet bénéfique sur la stimulation de système immunitaire, comme la production d'IFN- γ par les cellules NKT. L'intérêt de notre étude, utilisant un anticorps monoclonal bloquant anti-PD-1 qui cible un checkpoint immunologique, a été de montrer que les thérapies innovantes actuelles en cancérologie pourraient être envisagées comme une nouvelle approche thérapeutique en traumatologie, pour l'ensemble des traumatismes sévères dans le but de prévenir les infections secondaires.

1- Le modèle murin d'immunosuppression suite à une lésion médullaire haute

Le modèle de traumatisme médullaire est fréquemment utilisé pour étudier la réponse immunitaire au niveau de la moelle épinière. Seules quelques études ont utilisé ce modèle de traumatisme sévère pour étudier l'IS post-traumatique et en reproduire les principales

caractéristiques qui sont : une sensibilité accrue aux pneumonies, dans les premières 24 heures suivant la lésion médullaire une diminution importante en nombre des monocytes, des lymphocytes T et B, et une diminution de l'expression des molécules du CMH-II (Montgomerie 1997 ; Campagnolo et al. 2008 ; Riegger et al. 2009 ;).

Au sein du laboratoire, le modèle murin de traumatisme par un choc hémorragique a été le premier modèle d'étude de l'IS post-traumatique (Roquilly et al. 2013). Dans ce modèle, l'IS induite par le choc hémorragique est caractérisée par une diminution de l'expression de l'ARNm TNF- α , une diminution de la production d'IFN- γ et augmentation de la production d'IL-10, et une diminution de l'expression des molécules du CMH-II. La mise en place de nouveaux modèles de traumatismes sévères et fréquents, tel que la lésion médullaire semblait être une évidence pour étudier l'IS et la comparer aux données disponibles. Le modèle de lésion médullaire aiguë décrit dans ce travail réunit pour la première fois les principales caractéristiques de l'IS observée chez les patients traumatisés ou atteints de sepsis :

- Une sensibilité à une pneumonie à SASM
- A un temps précoce suivant le traumatisme médullaire, la présence d'une réponse immunitaire inflammatoire (SIRS : syndrome de la réponse inflammatoire)
- A un temps tardif suivant le traumatisme, la présence d'une IS compensatrice de la réponse inflammatoire (CARS : réponse anti-inflammatoire compensatrice)

Plusieurs critères de la présence d'une IS sont aussi retrouvés dans le modèle et dans l'ensemble des études de patients atteints de traumatisme médullaire ou d'autres traumatismes :

- Présence d'une lymphopénie
- Diminution de l'expression des molécules du CMH-II
- Diminution de la production de TNF- α
- Augmentation de la production d'IL-10
- Augmentation de l'expression de PD-1

J'ai fait une synthèse de plusieurs études regroupant les critères décrivant la présence d'une IS chez les patients avec un traumatisme médullaire, avec d'autres types de traumatismes ou atteints d'un sepsis (**Tableau 4**), et dans les modèles murins du traumatisme médullaire (**Tableau 5**).

Le modèle de traumatisme crânien mis en place depuis peu au sein du laboratoire est un modèle plus simple, moins contraignant, plus rapide à effectuer et à mettre en place par rapport au modèle de traumatisme médullaire. Il complètera utilement le modèle de lésion médullaire aiguë pour l'étude des pathologies aiguës du système nerveux central entraînant une IS. En effet, dans les suites du traumatisme crânien, les souris sont normales dans leur comportement et leur déplacement. Il n'y a donc pas de contraintes liées au mode d'alimentation ou d'accès à l'eau contrairement au modèle de traumatisme médullaire.

Tableau 4: Synthèse des principales caractéristiques d'une immunosuppression retrouvés chez les patients avec un traumatisme médullaire, de multi-traumatisme, un traumatisme crânien, une ischémie ou atteints d'un sepsis. (Mono : monocytes ; poly : polynucléaires)

	Pneumonie	Cellules immunes	Molécules
Traumatisme médullaire (SCI)			
(DeVivo et al. 1989)	1 ^{ère} cause de mortalité		
(Cruse et al. 1992)		↘ fonction des lymphocytes T et cellules NK	
(Montgomerie 1997)	↗ des pneumonies		
(Soden et al. 2000)	↗ pneumonie		
(Cotton et al. 2005)	↗ du risque de pneumonie		
(Campagnolo et al. 2008)		↗ des lymphocytes T CD3 ⁺ CD4 ⁺ ↘ de la fonction des cellules NK	
(Riegger et al. 2009)		↘ des monocytes, des lymphocytes T et B ↗ des granulocytes	↘ HLA-DR
(Failli et al. 2012)	↗ des pneumonies		
(Laginha et al. 2016)		↘ de la fonction des cellules NK	
Multi-trauma			
(Muehlstedt, Lyte, and Rodriguez 2002)	↗ des pneumonies		↘ HLA-DR ↗ IL-10
(Timmermans et al. 2016)	↗ des pneumonies		↘ TNF- α et IL-6 ↘ HLA-DR ↗ IL-10
Trauma crânien			
(Woiciechowsky et al. 1998)			↘ HLA-DR ↗ IL-10
(Bronchard et al. 2004)	↗ les pneumonies		
Ischémie			
(Chamorro, Urra, and Planas 2007)		↘ des mono, des poly et des lymphocytes	↘ IL-10
Sepsis			
(Ertel et al. 1995)			↘ TNF- α et IL-6
(Boomer et al. 2011)		↘ des lymphocytes T et B	↘ HLA-DR ↗ de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 ⁺ ↗ PD-1L et PD-2L sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes ↗ de CD69 sur les lymphocytes T

Tableau 5: Synthèse des principales caractéristiques d'une immunosuppression retrouvées dans des modèles de souris de traumatisme médullaire (SCI), mimant le scénario clinique.

Souris				
	Système nerveux/Système immunitaire	Pneumonie	Cellules immunes	Molécules
Traumatisme médullaire (SCI)				
(Riegger et al. 2007)			∨ des cellules dendritiques, des monocytes, des granulocytes, des lymphocytes T CD8 ⁺ et lymphocytes B	∨ CMH-II
(Lucin et al. 2007)	↗ de la Norépinephrine			
(Lucin, Sanders, and Popovich 2009)	∨ Poids/taille des rates		↗ de l'apoptose	
(Zhang et al. 2013)	↗ de la Norépinephrine ∨ Poids/taille des rates		∨ des lymphocytes B	
(Zha et al. 2014)	↗ de la Norépinephrine			∨ de production d'IFN- γ et de TNF- α par les lymphocytes T CD8 ⁺ ↗ PD-1L sur les macrophages et les lymphocytes B ↗ de PD-1 sur les lymphocytes T CD8 ⁺
(Brommer et al. 2016)	∨ du poids/taille des rates	↗ de la sensibilité aux pneumonies		
(Wang et al. 2016)				↗ des MDSC qui ont la capacité de bloquer la prolifération des lymphocytes T

Nous avons choisi une approche manuelle de la section médullaire avec des ciseaux placés entre deux vertèbres, dans la région la plus communément étudiée entre les vertèbres T3 à T9, avec une incision faite par voie dorsale. La technique utilisée pour la lésion médullaire ne permet pas de déterminer précisément la localisation de la section effectuée entre les vertèbres thoraciques T3 à T9. La rétraction des membres postérieurs, qui survient tout de suite après la lésion médullaire, permet seulement de confirmer que la section a bien été effectuée. Dans la partie introduction, il a été décrit qu'une lésion traumatique au niveau thoracique peut altérer le système nerveux sympathique (SNS), et en fonction du niveau de la lésion, l'innervation du SNS sur la rate peut être interrompue. Récemment, Brommer et collaborateurs ont démontré qu'une lésion au niveau de la vertèbre T9 n'entraînait pas d'atrophie de la rate contrairement à une lésion au niveau T3 (Brommer et al. 2016). Dans notre étude, une atrophie de la rate a été observée dans l'ensemble des animaux avec le traumatisme médullaire, suggérant que la lésion a été effectuée plus près de T3 que de T9. La méthode chirurgicale pour la mise en place de la lésion médullaire que nous avons utilisée permet une exécution rapide et simplifiée, avec une excellente reproductibilité de l'atrophie splénique par interruption de l'innervation sympathique. La mise en place ainsi que la validation du modèle représente les deux-tiers du temps du projet de doctorat.

Deux espèces bactériennes qui sont une cause majeure de pneumonies en soin intensif chez les patients traumatisés, ont été évaluées : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Le choix s'est porté sur *Staphylococcus aureus*. En effet, la mortalité des souris SCI infectées à *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) était de 80%, et de « seulement » 50% pour les souris SCI infectées à SASM. En plus d'étudier l'IS suite au traumatisme médullaire, un des objectifs de ce travail était aussi d'étudier la présence de l'IS suite à une pneumonie après un traumatisme. Il était donc important que l'effectif des souris SCI vivantes suite à la pneumonie reste suffisamment élevé. Enfin, si on considère la phase post-traumatique précoce, *Staphylococcus aureus* est l'une des premières causes de pneumopathie acquise à l'hôpital après un traumatisme sévère.

L'objectif principal a été de déterminer le temps le plus approprié montrant la présence d'une IS, réunissant un maximum des critères qui lui sont caractéristiques. Plusieurs temps ont été testés en post-opératoire, du plus précoce aux plus tardifs: 16h, 24h, 48h, 72h, 96h et 120h.

2- Résultats principaux

2.1 La validation du modèle de traumatisme médullaire

Suite à un traumatisme sévère, il y a deux phases de réponse du système immunitaire : la première phase consiste en une hyper activation du système immunitaire inné correspondant au syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), la seconde phase a pour but de restaurer l'homéostasie par une réponse immunitaire anti-inflammatoire (CARS) (Oberholzer, Oberholzer, and Moldawer 2001; Osuchowski et al. 2006; Hotchkiss et al. 2009). Nous avons retrouvé cette dynamique de réponse du système immunitaire dans le modèle souris de lésion médullaire aiguë décrit ici.

Suite à un traumatisme sévère, la destruction cellulaire s'accompagne de la libération de composants intracellulaires nommés « danger-associated molecular patterns » (DAMP) qui vont directement stimuler les « pattern recognition receptor » (PRR), présents sur les cellules de l'immunité innée (Zhang et al. 2010). Cette reconnaissance initie la réponse immunitaire, entraînant alors la maturation des cellules dendritiques avec une augmentation précoce de l'expression des molécules CMH-II, de la production de cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL-12 par les cellules dendritiques et l'IFN- γ par les cellules CD11c⁺ spléniques dans le modèle de traumatisme médullaire présenté ici. Suite au traumatisme médullaire dans notre modèle, une réponse hyper-inflammatoire est mise en place de manière précoce.

La pneumonie est l'une des principales causes de mortalité et de complications chez les patients atteints de lésion médullaire (Failli et al. 2012), elle est associée à un mauvais devenir neurologique. Lorsque la pneumonie est induite à un temps tardif, 3 jours post-traumatiques, correspondant alors à la phase d'IS, on observe une survie de 50% des animaux

traumatisés contre 80% chez des animaux sains. Cette IS a été caractérisée par différentes altérations du système immunitaire au niveau de l'organe majeur lymphoïde des souris :

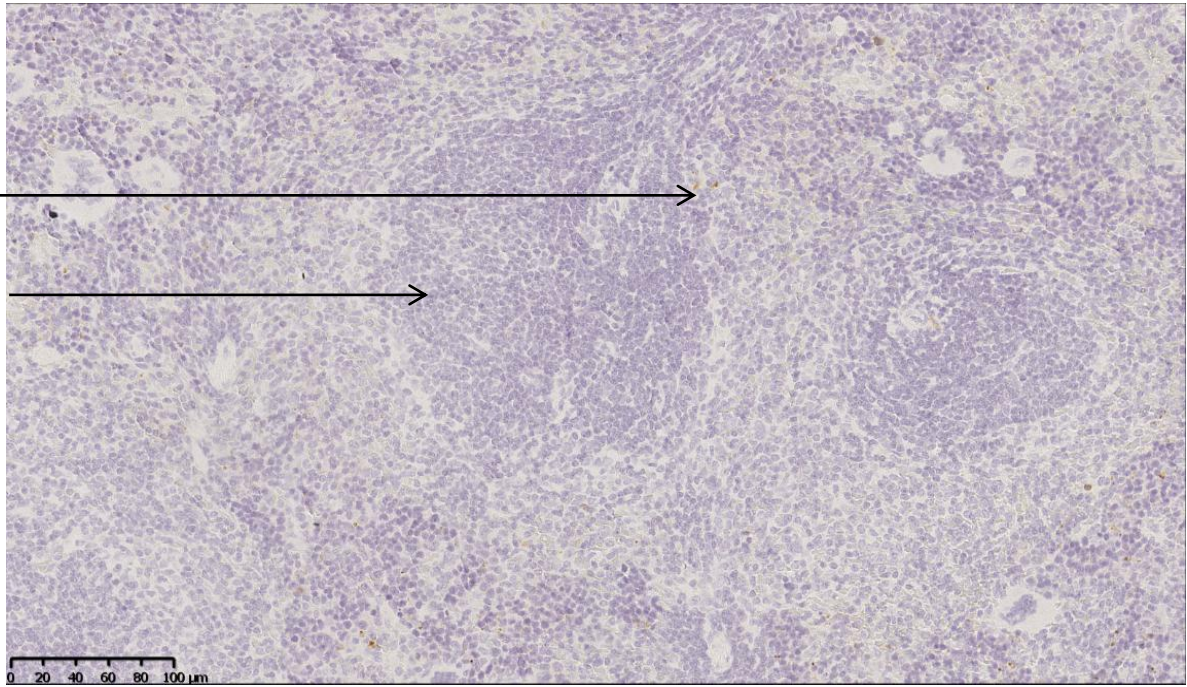
- une diminution du poids des rates
- une lymphopénie splénique
- une augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10
- une diminution de l'expression de la molécule du CMH-II sur les cellules dendritiques spléniques suite à la pneumonie.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la lymphopénie retrouvée au cours de l'IS post-traumatique. Tout d'abord, il pourrait y avoir une migration massive des lymphocytes spléniques vers le site de la lésion médullaire. Ou encore les lymphocytes spléniques ne recevraient plus de message normal du système nerveux central suite au traumatisme médullaire, les faisant migrer vers d'autres organes. La dernière hypothèse serait que la lymphopénie serait due à une augmentation de l'apoptose des lymphocytes spléniques suite au traumatisme.

Nous avons étudié cette dernière hypothèse par un marquage par immunofluorescence des cellules de la rate par la caspase-3 sous sa forme active dans les groupes Sham et SCI (**Figure 38**), post-opératoire. Le marquage des cellules en apoptose est principalement situé dans la zone de la pulpe blanche, qui est composée de lymphocytes.

Sham

Cellule
en apoptose



Pulpe
blanche

SCI

Pulpe
blanche

Cellules
en apoptose

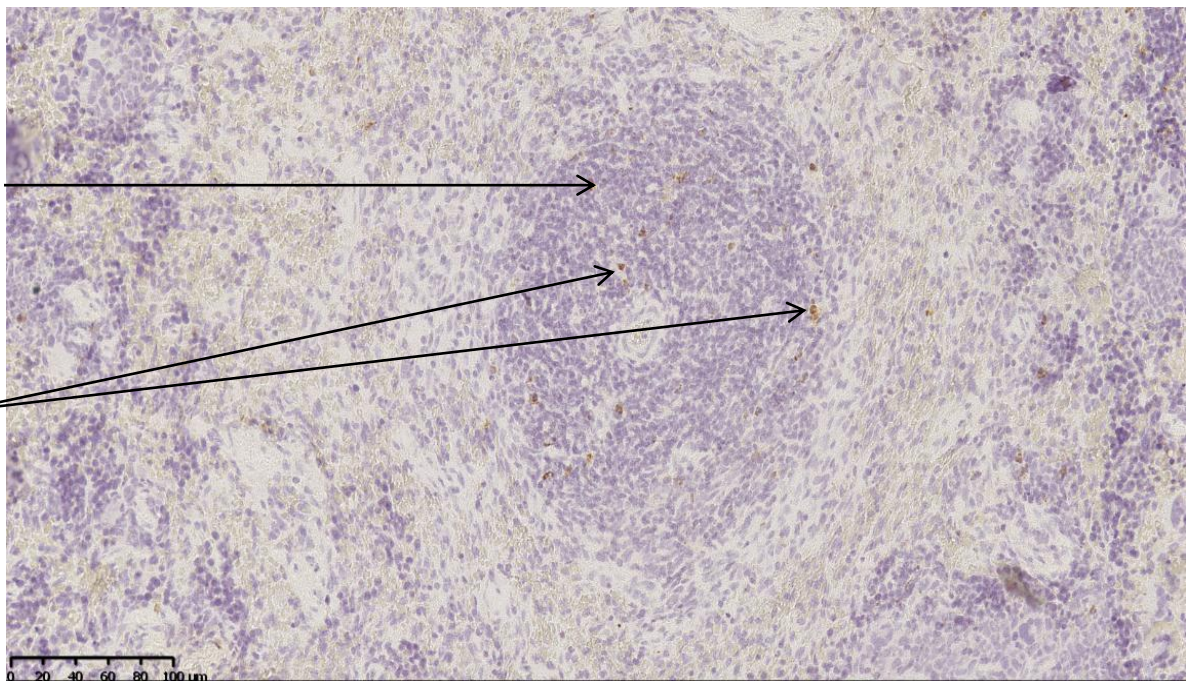
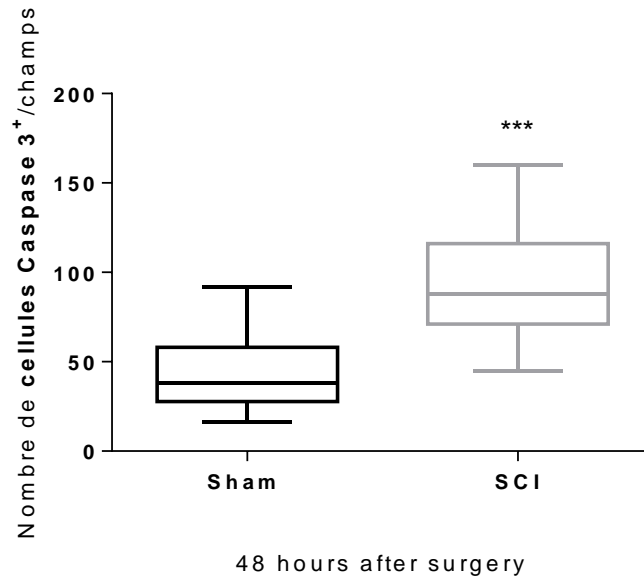


Figure 38: Coupe histologique de rates de souris Sham et SCI 48 heures post-opératoires. En marron : marquage de la caspase 3 (forme active). Grossissement (x20)



*Figure 39: Nombre de cellules Caspase 3+ par champs analysé, dans les souris Sham et SCI 48 heures post-opératoires. 9 champs sont analysés par rate de souris, avec un grossissement (x20). *** $p=0.0002$ test non paramétrique de Kruskal-Wallis.*

Nous confirmons l'hypothèse de la présence significative d'une apoptose lymphocytaire dans les rates des souris SCI par rapport aux souris Sham, à 48 heures post-opératoires (**Figure 39**).

Tout comme dans l'article de Chamorro et al, l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 augmente 48 heures après le traumatisme (Chamorro, Urra, and Planas 2007). Plusieurs travaux ont montré que l'activation du SNS entraînait une augmentation de la production d'IL-10 après un stress aigu (van der Poll et al. 1996, Woiciechowsky et al. 1998). Dans l'étude de van der Poll et collaborateurs., des patients sains ont été perfusés en continue pendant 3 heures ou 24 heures avec de l'épinéphrine, afin d'étudier son effet sur la réponse immunitaire par la production d'une cytokine inflammatoire (le TNF- α) et anti-inflammatoire (l'IL-10). Pour cela, les cellules mononuclées du sang (PBMC) de ces patients ont été étudiées suite à une injection intra-veineuse de LPS *in vivo*, ou par la mise en contact des cellules mononuclées sanguines avec du LPS *in vitro*. En temps normal, l'injection de LPS sur les PBMC d'individus sains augmente la production de TNF- α . Suite à une stimulation par l'adrénaline (épinéphrine), les cellules mononuclées sanguine diminuent leur production de TNF- α et augmentent leur production d'IL-10 (van der Poll et al. 1996). L'hypothèse serait que dans notre modèle de traumatisme médullaire, la lésion médullaire

entraînerait un arrêt du rétrocontrôle négatif du système nerveux sympathique, et provoquerait un relargage constant des catécholamines (comme la norépinephrine ou l'épinephrine notamment) entraînant une réponse immunitaire anti-inflammatoire par une diminution de l'expression du TNF- α et une augmentation d'IL-10.

Nous avons également observé une diminution de l'expression des molécules de CMH-II pendant la phase d'IS. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène :

- Fumeaux et collaborateurs. ont montré que les molécules du CMH-II sont endocytées et retenues en intracellulaire dans les monocytes des patients atteints de choc septique, et ce phénomène est partiellement médié par l'IL-10 (Fumeaux et al. 2002). Dans notre modèle murin de traumatisme médullaire, l'IL-10 est produite en grande quantité à partir de 48 heures suivant le traumatisme. L'hypothèse serait que dans le modèle de traumatisme médullaire, l'IL-10 favoriserait le phénomène d'endocytose du CMH-II et de sa retenue dans le cytoplasme des cellules dendritiques.
- Le phénotype des cellules dendritiques (DC) considérées comme matures comporte une augmentation de la régulation de CD80, CD83, CD86 et les molécules du CMH-II (Sousa 2006). La stimulation du récepteur β 2-AR sur les DC inhibe la translocation vers le noyau du facteur de transcription NF- κ B (Herve et al. 2013). Or, NF- κ B est essentiel pour les cellules dendritiques matures car il permet : une augmentation d'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40, l'augmentation de la production de la cytokine IL-12 et une augmentation de la capacité de cross-présentation (Yoshimura et al. 2001). Une stimulation du récepteur β 2-AR catécholergique entraîne une diminution de l'expression des molécules CD80, CD86, CD40. Dans le modèle murin de choc hémorragique, il est observé une diminution du nombre de cellules dendritiques matures (Roquilly et al. 2013). L'hypothèse serait que la sur-activation des récepteurs β 2-AR sur les DC entraînerait une inhibition de la translocation du facteur de transcription NF- κ B entraînant à son tour une diminution des marqueurs du phénotype mature des DC : CD80, CD86 et CMH-II. Il y aurait donc alors plus de cellules DC avec un phénotype immature, d'où une diminution de l'expression des molécules du CMH-II.

La présence du syndrome d'IS tardif touche aussi le système immunitaire adaptatif, avec une diminution de l'expression d'un marqueur d'épuisement lymphocytaire T, PD-1. C'est suite à ce dernier résultat que nous avons mis en place des essais d'immunothérapie par anticorps anti-PD-1 dans notre modèle de traumatisme médullaire.

2.2 PD-1 marqueur d'épuisement lymphocytaire T

Nos résultats sont concordants avec ceux retrouvés chez les patients présentant un sepsis sévère à *Candida* (Spec et al. 2015), ainsi qu'avec ceux de l'étude de Zha utilisant un modèle « souris » de traumatisme médullaire chronique (Zha et al. 2014) ; le récepteur PD-1 est surexprimé sur les lymphocytes T suite à un traumatisme sévère, tout comme dans notre modèle de souris de traumatisme médullaire. Mais d'autres cellules que les lymphocytes T peuvent présenter une modulation de l'expression de PD-1. Par exemple l'étude de Yao et al, sur des souris avec une lésion médullaire, montre que la déficience en PD-1 induit une polarisation des macrophages microgliaux vers un phénotype cellulaire pro-inflammatoire de type M1 (Yao et al. 2014). Dans l'étude de Huang et al, la surexpression de PD-1 joue un rôle clé dans l'altération de la fonction de phagocytose des macrophages et dans la modulation de la clairance de pathogènes et la réponse inflammatoire innée au sepsis (Huang et al. 2009). L'expression de PD-1 n'est pas toujours un signe d'altération des lymphocytes T, et il n'est pas exclusivement un marqueur d'épuisement lymphocytaire T. Chez des individus sains, PD-1 est impliqué dans des processus normaux de différenciation, de maturation et d'activation des lymphocytes T (Marraco et al. 2015). L'expression de PD-1 n'est peut-être pas un marqueur suffisant à lui seul pour établir un « épuisement lymphocytaire » de mauvais pronostic, et pour mettre en place une immunothérapie par anti-PD-1. La compilation de plusieurs marqueurs d'épuisement lymphocytaire T chez un patient en analysant ses PBMC par cytométrie en flux, pourrait être la solution afin d'envisager une approche thérapeutique individualisée.

D'autres marqueurs montrant le niveau hiérarchique d'épuisement lymphocytaire T après une lésion médullaire ont été étudiés comme : l'apoptose globale de cellules immunes spléniques, ou la diminution de l'expression de LAG-3. De plus, nous pourrions en parallèle

analyser la production de la cytokine IL-2, dont la diminution est un marqueur précoce d'épuisement lymphocytaire T.

2.3 L'immunothérapie par anti-PD-1

Avec ce résultat de la surexpression de PD-1 sur les lymphocytes T dans les suites d'une réponse inflammatoire induite par la lésion médullaire, nous proposons une nouvelle approche thérapeutique par immunothérapie visant à restaurer les fonctions de l'immunité adaptative (lymphocytes T) en traumatologie. Cette immunothérapie a consisté à administrer des anticorps anti-PD-1 après une lésion médullaire (SCI), ce qui a permis la restauration d'une réponse immunitaire propice à la protection contre une infection à SASM, et donc une amélioration de la survie des souris SCI infectées.

L'efficacité de l'immunothérapie par l'anticorps anti-PD1 a été démontrée sur le mélanome malin métastasé (Brahmer et al. 2010 ; Ott, Hodi, and Robert 2013). L'anticorps anti-PD1 a aussi été étudié dans un modèle de sepsis de souris, et des résultats ont montré que cette thérapie permettait d'inverser le dysfonctionnement immunitaire lors de l'IS (Brahmamdam et al. 2010; Chang et al. 2013 ; Hotchkiss, Monneret, and Payen 2013). Il est intéressant de noter que l'immunothérapie a été débutée 24 heures après la lésion médullaire aiguë et après la surexpression des molécules de PD-1 sur les lymphocytes T, dans notre modèle de traumatisme médullaire. Ces résultats concernant l'effet de l'anti-PD1 sur des souris SCI complètent le travail de Brahmamdam et collaborateurs., qui a montré que les anticorps anti-PD1 améliorent la survie des souris atteintes d'un sepsis sévère. En utilisant une concentration d'anticorps de 10mg/kg d'anti-PD1 (Brahmamdam et al. 2010), nos résultats montrent un effet néfaste sur la mortalité de nos souris SCI traitées, la mortalité plus élevée par rapport aux souris SCI non-traitées, suite à une pneumonie à SASM. La concentration de l'anticorps anti-PD1 a donc été réduite de cinquante fois (0,2mg/kg) correspondant à la dose la plus faible testée dans les travaux d'immunothérapie en cancérologie (Topalian et al. 2012 ; Harvey 2014). À cette concentration plus faible, l'anticorps anti-PD1 a un effet bénéfique en améliorant la survie des souris SCI, suite à une pneumonie à SASM. Notre étude montre bien l'importance de l'effet dose en immunothérapie dans le cas de l'inhibition de PD-1 en traumatologie. Des doses intermédiaires d'anticorps

anti-PD-1 pourraient être évaluées dans notre modèle de traumatisme médullaire afin de connaître la dose idéale pour une efficacité optimale.

Concernant la surmortalité avec la forte dose d'anticorps anti-PD1, l'hypothèse soulevée est qu'à cette dose de 10mg/kg la majorité des interactions entre PD-1 et ses ligands seraient bloquées, ayant alors pour conséquence la sur-activation des cellules immunitaires, accentuant le phénomène de réponse pro-inflammatoire déjà présent au temps où le traitement est débuté, soit 24 heures après le traumatisme médullaire. Nous ne ferions que prolonger le temps de la réponse hyper-inflammatoire suite au traumatisme médullaire et une fois le traitement terminé afin de retourner vers une homéostasie immunitaire l'IS serait alors plus importante. Les animaux traités à cette dose meurent probablement d'un dysfonctionnement de la réponse immunitaire face à la pneumonie, suite à une réponse hyper-inflammatoire du système immunitaire trop longue engendrant une réponse anti-inflammatoire importante augmentant l'amplitude de l'IS.

L'efficacité du traitement par immunothérapie de l'épuisement lymphocytaire peut être améliorée par la combinaison de plusieurs immuno-modulateurs comme l'anti-PD1 avec : l'anti-CTLA-4, l'anti-PD-1L (Ott, Hodi, and Robert 2013; Binder and Schreiber 2014), ou l'anti-LAG-3 (Woo et al. 2012). Des combinaisons similaires ont été étudiées dans un modèle murin de sepsis fongique (Chang et al. 2013). Dans cette étude, les auteurs ont travaillé sur un modèle de sepsis double hit avec un CLP (cecal ligation and puncture), consistant à ligaturer et perforer deux fois le caecum avec une aiguille. Une infection à *Candida albicans* a été pratiquée 3 jours après. Quarante-huit heures après le second hit, les animaux ont été traités par un anticorps anti-PD-1, ou anti-PD-1L ou anti-CTLA-4. Ces traitements ont pour conséquence un bénéfice sur la survie des animaux car ils augmentent la production d'IFN- γ et d'IL-6 (cytokines pro-inflammatoires) et l'expression des molécules du CMH-II. De récents résultats ont montré un meilleur effet de l'anti-PD1 contre l'IS *in vitro* avec les co-stimulateurs d'activation des lymphocytes T qui sont : l'IL-7 chez des patients atteints de sepsis sévères *in vitro* (Monneret and Venet 2012), et l'IL-15 dans des modèles de souris atteintes de sepsis (Inoue et al. 2010). Comme le suggère Hutchins et collaborateurs. , ces co-stimulateurs pourraient potentialiser la réponse immunitaire chez des patients

immunodéprimés mais les modalités d'utilisation de ces molécules, aux effets secondaires potentiellement sévères, reste encore à déterminer (Hutchins et al. 2014). Dans notre modèle de traumatisme médullaire, nous pourrions tester si l'ajout d'IL-7 ou d'IL-15 avec l'anticorps anti-PD-1 aurait un meilleur effet sur la restauration de la réponse immunitaire contre une pneumonie à SASM, et donc une augmentation de la survie des animaux traumatisés.

Nous nous sommes intéressés à l'effet de l'anticorps anti-PD1 sur le phénomène d'épuisement lymphocytaire T, et plus particulièrement sur la restauration de la production de l'IFN- γ , cytokine qui joue un rôle important dans la lutte contre les infections virales mais également bactériennes. Comme dans l'étude de sepsis fongique de Chang et al, l'immunothérapie par anti-PD1 entraîne une augmentation de la production de l'IFN- γ par les lymphocytes spléniques (Chang et al. 2013). De manière intéressante, nos résultats montrent que les cellules NKT jouent un rôle critique suite au traitement par l'anticorps anti-PD-1, qui leur permet de restaurer leur capacité à produire de l'IFN- γ (Wong et al. 2011).

Dans notre modèle souris de traumatisme médullaire suivi par une pneumonie à SASM, l'objectif du traitement par l'anticorps anti-PD-1 était de rétablir une réponse pro-inflammatoire et les cellules NKT pourraient jouer un rôle majeur. Les cellules iNKT, par leur production d'IFN- γ , vont augmenter les capacités de phagocytose des macrophages et la clairance bactérienne. La production d'IFN- γ va induire l'expression des molécules du CMH-I et CMH-II sur les cellules présentatrice d'antigènes (Keskinen et al. 1997 ; Ulevitch et al. 1991), permettant ainsi d'activer les lymphocytes T dans le but d'avoir une réponse pro-inflammatoire permettant d'éliminer le pathogène responsable de la pneumonie. Dans l'étude de Chang et collaborateurs. Utilisant un modèle de souris de mélanome métastatique, l'anticorps anti-PD-1 est administré un jour avant l'injection d' α GalCer (agoniste spécifique permettant de stimuler les cellules iNKT) sur l'ensemble des splénocytes. L'anticorps anti-PD-1 permet dans ce modèle de restaurer la fonction des iNKT en augmentant leur sécrétion de cytokines IFN- γ , IL-2 et IL-4, et leur fonction anti-tumorale (Chang et al. 2008). Il serait intéressant de regarder dans notre modèle de lésion médullaire si l'immunothérapie module la production des cytokines IL-2 et IL-4 par les cellules NKT. La sécrétion d'IL-2 permet la prolifération des lymphocytes T et leur activation. L'anticorps anti-PD-1 pourrait restaurer une réponse pro-inflammatoire par l'intermédiaire des cellules iNKT via les phénomènes précédemment cités.

Il est probable que l'anticorps anti-PD-1 permet de restaurer les capacités des cellules NKT à détecter les infections après une lésion médullaire. Avec la faible dose d'anti-PD1, il n'y a pas d'augmentation de la proportion des lymphocytes et des cellules dendritiques de la rate tels qu'ils sont décrits dans les résultats de Brahmamdam et al. Nous pourrions envisager dans un futur proche de tester des doses intermédiaires de l'anticorps anti-PD1, afin d'observer des effets plus importants sur l'augmentation des cellules immunes de la rate et sur la réponse inflammatoire, dans notre modèle de traumatisme médullaire chez la souris.

3. Perspectives

Ces travaux ouvrent la voie sur l'évaluation de l'effet dose de l'immunothérapie qui doit être adaptée au type de traumatisme, et à chaque individu. Une étude de Guignan et collaborateurs. a montré qu'il existait une corrélation entre l'augmentation de l'expression de PD-1 et la mortalité des patients avec un choc septique (Guignant et al. 2011). Par la suite, il s'est avéré que dans le cas de sepsis, de meilleurs résultats étaient obtenus pour prédire la mortalité des patients avec l'expression de PD-1L sur les monocytes, et non de PD-1 sur les lymphocytes (Monneret, Gossez, and Venet 2016). Des études cliniques chez des patients atteints de sepsis sont envisagées avec un traitement par immunothérapie par anti-PD-1L. Mais une fois de plus, il faudra adapter la dose ainsi que le traitement en fonction du patient. A l'avenir, ces molécules pourraient être un biomarqueur évaluable par cytométrie en flux, permettant d'identifier une déficience immunitaire d'un patient après un traumatisme. Les anticorps monoclonaux bloquant ces molécules inhibitrices seraient des candidats idéaux pour une immunothérapie par des molécules constituant des « checkpoints » contrôlant l'homéostasie immunitaire. Ces biomarqueurs (CTLA-4, PD-1, PD-1L, LAG-3, IFN- γ , IL-2) pourront peut-être être généralisés à l'ensemble des traumatismes sévères pour identifier un état d'épuisement lymphocytaire T permettant la mise en place rapide d'une immunothérapie correctrice. Enfin, d'autres résultats concernant l'immunothérapie dans le cas du sepsis, suggèrent un meilleur effet de l'anticorps anti-PD1 pour lutter contre l'IS en présence de cytokines co-stimulateurs de l'activation des lymphocytes T telles que l'IL-7 et IL-15, (Hutchins et al. 2014).

En parallèle, ces travaux permettent d'envisager de nouvelles études sur l'effet direct ou indirect de l'anti-PD-1 sur les cellules NKT, à partir du modèle murin de traumatisme médullaire ou avec les autres modèles de traumatisme sévère qui existent au sein du laboratoire. L'effet direct de l'anticorps anti-PD-1 sur les cellules NKT sera évalué ex vivo de la manière suivante : en isolant les cellules NKT du foie de souris SCI par billes magnétiques, ou en utilisant un trieur, puis en les mettant en culture avec de l'IL-2 et en présence ou non d'anticorps anti-PD-1. L'effet indirect de l'anticorps anti-PD-1 par l'environnement cellulaire sur les cellules NKT sera évalué ex vivo en prenant l'ensemble des

cellules immunitaires du foie pour les mettre en culture en présence ou non d'anticorps anti-PD-1. Dans les deux cas nous étudierons la réponse pro-inflammatoire par la production d'IFN- γ .

D'autres travaux en parallèle pourront être effectués pour étudier le lien entre le système nerveux central et le système immunitaire suite à un traumatisme sévère. Les niveaux des catécholamines pourront être analysés chez nos souris SCI, et des antagonistes des récepteurs β_2 -adrénergiques pourront être testés pour savoir s'ils ont des conséquences sur la restauration d'une réponse inflammatoire par la production de cytokines TNF- α ou IFN- γ . Des tests sur l'effet des catécholamines sur la modulation de l'expression des molécules du CMH-II sur les cellules dendritiques pourraient être réalisés.

Une autre étude pourrait être faite sur le rôle du microbiote dans le traumatisme médullaire. Avec 10 fois plus de bactéries que de cellules eucaryotes composant le corps humain, le microbiote joue un rôle majeur dans l'interaction avec son hôte. Il est de plus en plus étudié dans les maladies humaines, car son rôle s'est révélé être très important dans son interaction avec son environnement. L'étude de Gungor et collaborateurs. a montré que les patients atteints d'une lésion médullaire, qui présentent fréquemment des dysfonctionnements du système gastro-intestinal, avaient un important changement dans leur composition de leur microbiote intestinal (Gungor et al. 2016). Les bactéries Firmicutes et Bacteroides ssp sont le phylum le plus prédominant dans l'intestin. Ils fermentent des polysaccharides et génèrent des métabolites comme le butyrate, l'acétate ou le propionate qui peuvent être utilisés comme énergie par l'hôte. Le butyrate est l'acide gras à chaîne unique qui a des effets sur la modulation de la croissance et la différenciation des cellules épithéliales, et la fonction immunitaire (Arpaia et al. 2013). Les phylums producteurs de butyrate sont spécifiquement réduits chez les patients atteints de traumatisme médullaire (Gungor et al. 2016). L'hypothèse émise est que le microbiote aurait un rôle central dans le dysfonctionnement immunitaire après un traumatisme médullaire. D'ailleurs Li et collaborateurs. , ont traités un patient atteint d'un sepsis sévère par transplantions de microbiote fécal d'un donneur sain (Li et al. 2015).

En cancérologie, des études ont montré que des bactéries commensales comme *Bifidobacterium* associée à l'immunothérapie par anti-PD-1L facilitait l'efficacité anti-

tumorale du traitement (Sivan et al. 2015). L'efficacité de l'immunothérapie par anti-CTLA-4 chez des souris avec un mélanome était modifiée par la composition du microbiote, et plus particulièrement par l'espèce bactérienne *Bacteroides fragilis* ou *Bacteroides thetaiotaomicron* (Vétizou et al. 2015). L'administration de ces bactéries chez ces souris modifie l'activité de l'anti-CTLA-4, et réduit la réponse inflammatoire initié par cet anticorps dans l'intestin. Il serait intéressant d'étudier l'impact d'une transplantation fécale d'un donneur sain dans le modèle de souris de lésion médullaire avec ou sans immunothérapie.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Aguiar Júnior, Wagner de, Carmen Mohamad Rida Saleh, and Iveth Yamaguchi Whitaker. 2016. "Risk Factors for Complications of Traumatic Injuries." *Journal of Trauma Nursing: The Official Journal of the Society of Trauma Nurses* 23 (5): 275–83. doi:10.1097/JTN.0000000000000233.
- Akhtar, Aysha Z., John J. Pippin, and Chad B. Sandusky. 2008. "Animal Models in Spinal Cord Injury: A Review." *Reviews in the Neurosciences* 19 (1): 47–60.
- Albert, T., and J.-F. Ravaud. 2005. "Rehabilitation of Spinal Cord Injury in France: A Nationwide Multicentre Study of Incidence and Regional Disparities." *Spinal Cord* 43 (6): 357–65. doi:10.1038/sj.sc.3101717.
- Anderson, Kim D., Kelli G. Sharp, and Oswald Steward. 2009. "Bilateral Cervical Contusion Spinal Cord Injury in Rats." *Experimental Neurology* 220 (1): 9–22. doi:10.1016/j.expneurol.2009.06.012.
- Armendariz-Borunda, Juan, Robert O. Endres, Leslie R. Ballou, and Arnold E. Postlethwaite. 1996. "Transforming Growth Factor-Beta Inhibits Interferon-Gamma-Induced HLA-DR Expression by Cultured Human Fibroblasts." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 28 (10): 1107–16. doi:10.1016/1357-2725(96)00067-2.
- Arpaia, Nicholas, Clarissa Campbell, Xiyang Fan, Stanislav Dikiy, Joris van der Veeken, Paul deRoos, Hui Liu, et al. 2013. "Metabolites Produced by Commensal Bacteria Promote Peripheral Regulatory T Cell Generation." *Nature* 504 (7480):451–55. <https://doi.org/10.1038/nature12726>.
- Asehnoune, Karim, Catherine Fitting, Alain R Edouard, Claudine Cosson, Dan Benhamou, Jean-Marc Cavaillon, and Pierre Moine. 2006. "Influence of Resuscitation Volume on Blood Cells

TNF Production in a Murine Model of Haemorrhage.” *Resuscitation* 68 (1): 127–33. doi:10.1016/j.resuscitation.2005.05.015.

Asehnoune, Karim, Antoine Roquilly, and Edward Abraham. 2012. “Innate Immune Dysfunction in Trauma Patients: From Pathophysiology to Treatment.” *Anesthesiology* 117 (2): 411–16. doi:10.1097/ALN.0b013e31825f018d.

Asehnoune, Karim, Philippe Seguin, Jeremy Allary, Fanny Feuillet, Sigismond Lasocki, Fabrice Cook, Hervé Floch, et al. 2014. “Hydrocortisone and Fludrocortisone for Prevention of Hospital-Acquired Pneumonia in Patients with Severe Traumatic Brain Injury (Corti-TC): A Double-Blind, Multicentre Phase 3, Randomised Placebo-Controlled Trial.” *The Lancet. Respiratory Medicine* 2 (9):706–16. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70144-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70144-4).

Balkhi, Mumtaz Y., Qiangzhong Ma, Shazia Ahmad, and Richard P. Junghans. 2015. “T Cell Exhaustion and Interleukin 2 Downregulation.” *Cytokine* 71 (2): 339–47. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.024.

Barber, Daniel L., E. John Wherry, David Masopust, Baogong Zhu, James P. Allison, Arlene H. Sharpe, Gordon J. Freeman, and Rafi Ahmed. 2006. “Restoring Function in Exhausted CD8 T Cells during Chronic Viral Infection.” *Nature* 439 (7077): 682–87. doi:10.1038/nature04444.

Battistuzzo, Camila R., Robert J. Callister, Robin Callister, and Mary P. Galea. 2012. “A Systematic Review of Exercise Training To Promote Locomotor Recovery in Animal Models of Spinal Cord Injury.” *Journal of Neurotrauma* 29 (8): 1600–1613. doi:10.1089/neu.2011.2199.

Bendelac, Albert, Paul B. Savage, and Luc Teyton. 2007. “The Biology of NKT Cells.” *Annual Review of Immunology* 25 (1): 297–336. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.

Binder, David C., and Hans Schreiber. 2014. “Dual Blockade of PD-1 and CTLA-4 Combined with Tumor Vaccine Effectively Restores T-Cell Rejection Function in Tumors—Letter.” *Cancer Research* 74 (2): 632–632. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2216.

- Blackburn, Shawn D., Haina Shin, W. Nicholas Haining, Tao Zou, Creg J. Workman, Antonio Polley, Michael R. Betts, Gordon J. Freeman, Dario A. A. Vignali, and E. John Wherry. 2009. "Coregulation of CD8+ T Cell Exhaustion by Multiple Inhibitory Receptors during Chronic Viral Infection." *Nature Immunology* 10 (1): 29–37. doi:10.1038/ni.1679.
- Boomer, Jonathan S, Kathleen To, Kathy C Chang, Osamu Takasu, Dale F Osborne, Andrew H Walton, Traci L Bricker, et al. 2011. "Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 306 (23): 2594–2605. doi:10.1001/jama.2011.1829.
- Boomer, Jonathan S, Jonathan M Green, and Richard S Hotchkiss. 2014. "The Changing Immune System in Sepsis." *Virulence* 5 (1): 45–56. doi:10.4161/viru.26516.
- Boque, M. C., M. Bodi, and J. Rello. 2000. "Trauma, Head Injury, and Neurosurgery Infections." *Seminars in Respiratory Infections* 15 (4): 280–86.
- Borg, Natalie A., Kwok S. Wun, Lars Kjer-Nielsen, Matthew C. J. Wilce, Daniel G. Pellicci, Ruide Koh, Gurdyal S. Besra, et al. 2007. "CD1d–lipid-Antigen Recognition by the Semi-Invariant NKT T-Cell Receptor." *Nature* 448 (7149): 44–49. doi:10.1038/nature05907.
- Brahmamdham, Pavan, Shigeaki Inoue, Jacqueline Unsinger, Katherine C. Chang, Jonathan E. McDunn, and Richard S. Hotchkiss. 2010. "Delayed Administration of Anti-PD-1 Antibody Reverses Immune Dysfunction and Improves Survival during Sepsis." *Journal of Leukocyte Biology* 88 (2): 233–40. doi:10.1189/jlb.0110037.
- Brahmer, Julie R, Charles G Drake, Ira Wollner, John D Powderly, Joel Picus, William H Sharfman, Elizabeth Stankevich, et al. 2010. "Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (19): 3167–75. doi:10.1200/JCO.2009.26.7609.

- Brommer, Benedikt, Odilo Engel, Marcel A. Kopp, Ralf Watzlawick, Susanne Müller, Harald Prüss, Yuying Chen, et al. 2016. “Spinal Cord Injury-Induced Immune Deficiency Syndrome Enhances Infection Susceptibility Dependent on Lesion Level.” *Brain* 139 (3): 692–707. doi:10.1093/brain/awv375.
- Bronchard, Régis, Pierre Albaladejo, Gilles Brezac, Arnaud Geffroy, Pierre-François Seince, William Morris, Catherine Branger, and Jean Marty. 2004. “Early Onset Pneumonia: Risk Factors and Consequences in Head Trauma Patients.” *Anesthesiology* 100 (2): 234–39.
- Brooks, David G., Luc Teyton, Michael B. A. Oldstone, and Dorian B. McGavern. 2005. “Intrinsic Functional Dysregulation of CD4 T Cells Occurs Rapidly Following Persistent Viral Infection.” *Journal of Virology* 79 (16): 10514–27. doi:10.1128/JVI.79.16.10514-10527.2005.
- Broquet, Alexis, Antoine Roquilly, Cédric Jacqueline, Gilles Potel, Jocelyne Caillon, and Karim Asehnoune. 2014. “Depletion of Natural Killer Cells Increases Mice Susceptibility in a Pseudomonas Aeruginosa Pneumonia Model*.” *Critical Care Medicine* 42 (6):e441-450. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000311>.
- Brutkiewicz, Randy R. 2006. “CD1d Ligands: The Good, the Bad, and the Ugly.” *The Journal of Immunology* 177 (2):769–75. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.769>.
- Burgess, A. W., and D. Metcalf. 1980. “The Nature and Action of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factors.” *Blood* 56 (6): 947–58.
- Butte, Manish J., Mary E. Keir, Theresa B. Phamduy, Gordon J. Freeman, and Arlene H. Sharpe. 2007. “PD-L1 Interacts Specifically with B7-1 to Inhibit T Cell Proliferation.” *Immunity* 27 (1): 111–22. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.016.
- Bylund, D. B., D. C. Eikenberg, J. P. Hieble, S. Z. Langer, R. J. Lefkowitz, K. P. Minneman, P. B. Molinoff, R. R. Ruffolo, and U. Trendelenburg. 1994. “International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors.” *Pharmacological Reviews* 46 (2): 121–36.

- Campagnolo, DI, D Dixon, J Schwartz, JA Bartlett, and SE Keller. 2008. "Altered Innate Immunity Following Spinal Cord Injury." *Spinal Cord* 46 (7):477–81. <https://doi.org/10.1038/sc.2008.4>.
- Cano, Georgina, Alan F. Sved, Linda Rinaman, Bruce S. Rabin, and J. Patrick Card. 2001. "Characterization of the Central Nervous System Innervation of the Rat Spleen Using Viral Transneuronal Tracing." *The Journal of Comparative Neurology* 439 (1): 1–18. doi:10.1002/cne.1331.
- Cella, Marina, Anneke Engering, Valerie Pinet, Jean Pieters, and Antonio Lanzavecchia. 1997. "Inflammatory Stimuli Induce Accumulation of MHC Class II Complexes on Dendritic Cells." *Nature* 388 (6644): 782–87. doi:10.1038/42030.
- Cella, Marina, Anja Fuchs, William Vermi, Fabio Facchetti, Karel Otero, Jochen K. M. Lennerz, Jason M. Doherty, Jason C. Mills, and Marco Colonna. 2009. "A Human Natural Killer Cell Subset Provides an Innate Source of IL-22 for Mucosal Immunity." *Nature* 457 (7230): 722–25. doi:10.1038/nature07537.
- Chamorro, Angel, Xabier Urrea, and Anna M Planas. 2007. "Infection after Acute Ischemic Stroke: A Manifestation of Brain-Induced Immunodepression." *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 38 (3): 1097–1103. doi:10.1161/01.STR.0000258346.68966.9d.
- Chang, Woo-Sung, Ji-Yeon Kim, Yeon-Jeong Kim, Yun-Sun Kim, Jung-Mi Lee, Miyuki Azuma, Hideo Yagita, and Chang-Yuil Kang. 2008. "Cutting Edge: Programmed Death-1/Programmed Death Ligand 1 Interaction Regulates the Induction and Maintenance of Invariant NKT Cell Anergy." *The Journal of Immunology* 181 (10):6707–10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6707>.
- Chang, Katherine C, Carey-Ann Burnham, Stephanie M Compton, David P Rasche, RichardJ Mazuski, Jacquelyn S McDonough, Jacqueline Unsinger, Alan J Korman, Jonathan M Green, and Richard S Hotchkiss. 2013. "Blockade Of the Negative Co-Stimulatory Molecules PD-1

and CTLA-4 Improves Survival in Primary and Secondary Fungal Sepsis.” *Critical Care* 17 (3): R85. doi:10.1186/cc12711.

Chenouard, Alexis, Mélanie Chesneau, Faouzi Braza, Thomas Dejoie, Raphael Cinotti, Antoine Roquilly, Sophie Brouard, and Karim Asehnoune. 2015. “Phenotype and Functions of B Cells in Patients with Acute Brain Injuries.” *Molecular Immunology* 68 (2, Part A):350–56. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.001>.

Chiche, Laurent, Jean-Marie Forel, Guillemette Thomas, Catherine Farnarier, Frédéric Vely, Mathieu Bléry, Laurent Papazian, and Eric Vivier. 2011. “The Role of Natural Killer Cells in Sepsis.” *BioMed Research International* 2011 (May): e986491. doi:10.1155/2011/986491.

Cooper, Megan A, Todd A Fehniger, and Michael A Caligiuri. 2001. “The Biology of Human Natural Killer-Cell Subsets.” *Trends in Immunology* 22 (11): 633–40. doi:10.1016/S1471-4906(01)02060-9.

Curtsinger, Julie M, and Matthew F Mescher. 2010. “Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation.” *Current Opinion in Immunology*, Lymphocyte activation and effector functions • Vaccines, 22 (3): 333–40. doi:10.1016/j.coi.2010.02.013.

Day, Cheryl L., Daniel E. Kaufmann, Photini Kiepiela, Julia A. Brown, Eshia S. Moodley, Sharon Reddy, Elizabeth W. Mackey, et al. 2006. “PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated with T-Cell Exhaustion and Disease Progression.” *Nature* 443 (7109): 350–54. doi:10.1038/nature05115.

Dieli, Francesco, Guido Sireci, Domenica Russo, Masaru Taniguchi, Juraj Ivanyi, Carmen Fernandez, Marita Troye-Blomberg, Giacomo De Leo, and Alfredo Salerno. 2000. “Resistance of Natural Killer T Cell–Deficient Mice to Systemic Shwartzman Reaction.” *The Journal of Experimental Medicine* 192 (11): 1645.

Döcke, Wolf-Dietrich, Felix Randow, Uta Syrbe, Dietmar Krausch, Khusru Asadullah, Petre Reinke, Hans-Dieter Volk, and Wolfgang Kox. 1997. “Monocyte Deactivation in Septic

Patients: Restoration by IFN- γ Treatment.” *Nature Medicine* 3 (6): 678–81.
doi:10.1038/nm0697-678.

Ertel, W, J P Kremer, J Kenney, U Steckholzer, D Jarrar, O Trentz, and F W Schildberg. 1995. “Downregulation of Proinflammatory Cytokine Release in Whole Blood from Septic Patients.” *Blood* 85 (5): 1341–47.

Failli, Vieri, Marcel A. Kopp, Christine Gericke, Peter Martus, Susann Klingbeil, Benedikt Brommer, Inês Laginha, et al. 2012. “Functional Neurological Recovery after Spinal Cord Injury Is Impaired in Patients with Infections.” *Brain* 135 (11): 3238–50.
doi:10.1093/brain/aws267.

Farag, Sherif S, and Michael A Caligiuri. 2006. “Human Natural Killer Cell Development and Biology.” *Blood Reviews* 20 (3):123–37. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2005.10.001>.

Felten, D. L., S. Y. Felten, S. L. Carlson, J. A. Olschowka, and S. Livnat. 1985. “Noradrenergic and Peptidergic Innervation of Lymphoid Tissue.” *The Journal of Immunology* 135 (2): 755–65.

Flohé, Stefanie B, Hemant Agrawal, Sascha Flohé, Meenakshi Rani, Jörg M Bangen, and F Ulrich Schade. 2008. “Diversity of Interferon γ and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Restoring Immune Dysfunction of Dendritic Cells and Macrophages During Polymicrobial Sepsis.” *Molecular Medicine* 14 (5–6): 247–56. doi:10.2119/2007-00120.Flohe.

Francisco, Loise M., Peter T. Sage, and Arlene H. Sharpe. 2010. “The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity.” *Immunological Reviews* 236 (July):219–42.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x>.

Fumeaux, Thierry, and Jérôme Pugin. 2002. “Role of Interleukin-10 in the Intracellular Sequestration of Human Leukocyte Antigen-DR in Monocytes during Septic Shock.”

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 166 (11): 1475–82.
doi:10.1164/rccm.200203-217OC.

Gasteiger, Georg, and Alexander Y. Rudensky. 2014. “Opinion: Interactions of Innate and Adaptive Lymphocytes.” *Nature Reviews. Immunology* 14 (9): 631–39. doi:10.1038/nri3726.

Ghebeh, Hazem, Shamayel Mohammed, Abeer Al-Omair, Amal Qattan, Cynthia Lehe, Ghofran Al-Qudaihi, Naser Elkum, et al. 2006. “The B7-H1 (PD-L1) T Lymphocyte-Inhibitory Molecule Is Expressed in Breast Cancer Patients with Infiltrating Ductal Carcinoma: Correlation with Important High-Risk Prognostic Factors.” *Neoplasia (New York, N.Y.)* 8 (3): 190–98.

Godfrey, Dale I., Kirsten J. L. Hammond, Lynn D. Poulton, Mark J. Smyth, and Alan G. Baxter. 2000. “NKT Cells: Facts, Functions and Fallacies.” *Immunology Today* 21 (11): 573–83. doi:10.1016/S0167-5699(00)01735-7.

Godfrey, Dale I., Sanda Stankovic, and Alan G. Baxter. 2010. “Raising the NKT Cell Family.” *Nature Immunology* 11 (3): 197–206. doi:10.1038/ni.1841.

Godfrey, Dale I., Adam P. Uldrich, James McCluskey, Jamie Rossjohn, and D. Branch Moody. 2015. “The Burgeoning Family of Unconventional T Cells.” *Nature Immunology* 16 (11): 1114–23. doi:10.1038/ni.3298.

Guignant, Caroline, Alain Lepape, Xin Huang, Hakim Kherouf, Laure Denis, Françoise Poitevin, Christophe Malcus, et al. 2011. “Programmed Death-1 Levels Correlate with Increased Mortality, Nosocomial Infection and Immune Dysfunctions in Septic Shock Patients.” *Critical Care* 15 (2): R99. doi:10.1186/cc10112.

Gungor, Bilgi, Emre Adiguzel, Ihsan Gursel, Bilge Yilmaz, and Mayda Gursel. 2016. “Intestinal Microbiota in Patients with Spinal Cord Injury.” *PLoS ONE* 11 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145878>.

- Hamilton, John A. 2002. "GM-CSF in Inflammation and Autoimmunity." *Trends in Immunology* 23 (8): 403–8. doi:10.1016/S1471-4906(02)02260-3.
- Harvey, R. D. 2014. "Immunologic and Clinical Effects of Targeting PD-1 in Lung Cancer." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 96 (2):214–23. <https://doi.org/10.1038/clpt.2014.74>.
- Hazlett, Linda D., Xiaowen L. Rudner, Sharon A. McClellan, Ronald P. Barrett, and Shahrzad Lighvani. 2002. "Role of IL-12 and IFN-Gamma in Pseudomonas Aeruginosa Corneal Infection." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (2):419–24.
- Herve, J., L. Dubreil, V. Tardif, M. Terme, S. Pogu, B. Rozec, I. Anegon, et al. 2013. "P2090 Rôle Tolérogène de La Stimulation b2-Adrénérique Des Cellules Dendritiques." *Diabetes & Metabolism*, Résumés des communications de la réunion scientifique de la SFD, de la SFD Paramédical et de l'AJD, 39 (March): A89. doi:10.1016/S1262-3636(13)72000-7.
- Hetherington, H., and R. J. Earlam. 1995. "Measurement of Disability after Multiple Injuries: The Functional Independence Measure. Clinical Review." *The European Journal of Surgery = Acta Chirurgica* 161 (8): 549–55.
- Hotchkiss, Richard S., Kevin W. Tinsley, Paul E. Swanson, Robert E. Schmiegl, Jia Ji Hui, Katherine C. Chang, Dale F. Osborne, et al. 2001. "Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4+ T Lymphocytes in Humans." *The Journal of Immunology* 166 (11): 6952–63. doi:10.4049/jimmunol.166.11.6952.
- Hotchkiss, Richard S., Kevin W. Tinsley, Paul E. Swanson, Mitchell H. Grayson, Dale F. Osborne, Tracey H. Wagner, J. Perren Cobb, Craig Coopersmith, and Irene E. Karl. 2002. "Depletion of Dendritic Cells, But Not Macrophages, in Patients with Sepsis." *The Journal of Immunology* 168 (5): 2493–2500. doi:10.4049/jimmunol.168.5.2493.
- Hotchkiss, Richard S, Craig M Coopersmith, Jonathan E McDunn, and Thomas A Ferguson. 2009. "The Sepsis Seesaw: Tilting toward Immunosuppression." *Nature Medicine* 15 (5):496–97. <https://doi.org/10.1038/nm0509-496>.

- Hotchkiss, Richard S, Guillaume Monneret, and Didier Payen. 2013. "Immunosuppression in Sepsis: A Novel Understanding of the Disorder and a New Therapeutic Approach." *The Lancet Infectious Diseases* 13 (3): 260–68. doi:10.1016/S1473-3099(13)70001-X.
- Huang, Xin, Fabienne Venet, Yvonne L. Wang, Alain Lepape, Zhenglong Yuan, Yaping Chen, Ryan Swan, et al. 2009. "PD-1 Expression by Macrophages Plays a Pathologic Role in Altering Microbial Clearance and the Innate Inflammatory Response to Sepsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (15): 6303–8. doi:10.1073/pnas.0809422106.
- Huang, Li-feng, Yong-ming Yao, Ning Dong, Yan Yu, Li-xin He, and Zhi-yong Sheng. 2010. "Association between Regulatory T Cell Activity and Sepsis and Outcome of Severely Burned Patients: A Prospective, Observational Study." *Critical Care* 14 (1): R3. doi:10.1186/cc8232.
- Hutchins, Noelle A., Jacqueline Unsinger, Richard S. Hotchkiss, and Alfred Ayala. 2014. "The New Normal: Immunomodulatory Agents against Sepsis Immune Suppression." *Trends in Molecular Medicine*, Special issue: Sepsis, 20 (4): 224–33. doi:10.1016/j.molmed.2014.01.002.
- Inoue, Shigeaki, Jacqueline Unsinger, Christopher G. Davis, Jared T. Muenzer, Thomas A. Ferguson, Katherine Chang, Dale F. Osborne, et al. 2010. "IL-15 Prevents Apoptosis, Reverses Innate and Adaptive Immune Dysfunction, and Improves Survival in Sepsis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (3): 1401–9. doi:10.4049/jimmunol.0902307.
- Irwin, M, R L Hauger, L Jones, M Provencio, and K T Britton. 1990. "Sympathetic Nervous System Mediates Central Corticotropin-Releasing Factor Induced Suppression of Natural Killer Cytotoxicity." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 255 (1): 101–7.

- Jacqueline, Cédric, Alexis Broquet, Antoine Roquilly, Marion Davieau, Jocelyne Caillon, Frédéric Altare, Gilles Potel, and Karim Asehnoune. 2014. “Linezolid Dampens Neutrophil-Mediated Inflammation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*-Induced Pneumonia and Protects the Lung of Associated Damages.” *Journal of Infectious Diseases* 210 (5): 814–23. doi:10.1093/infdis/jiu145.
- Kawasaki, Takashi, William J. Hubbard, Mashkoor A. Choudhry, Martin G. Schwacha, Kirby I. Bland, and Irshad H. Chaudry. 2006. “Trauma-Hemorrhage Induces Depressed Splenic Dendritic Cell Functions in Mice.” *The Journal of Immunology* 177 (7): 4514–20. doi:10.4049/jimmunol.177.7.4514.
- Keir, Mary E, Loise M Francisco, and Arlene H Sharpe. 2007. “PD-1 and Its Ligands in T-Cell Immunity.” *Current Opinion in Immunology*, Lymphocyte activation/Lymphocyte effector functions, 19 (3): 309–14. doi:10.1016/j.coi.2007.04.012.
- Keir, Mary E, Manish J Butte, Gordon J Freeman, and Arlene H Sharpe. 2008. “PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity.” *Annual Review of Immunology* 26: 677–704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- Keskinen, P, T Ronni, S Matikainen, A Lehtonen, et I Julkunen. 1997. « Regulation of HLA class I and II expression by interferons and influenza A virus in human peripheral blood mononuclear cells. » *Immunology* 91 (3):421-29.
- Kim, Oh Yoen, Antoine Monsel, Michèle Bertrand, Pierre Coriat, Jean-Marc Cavaillon, and Minou Adib-Conquy. 2010. “Differential down-Regulation of HLA-DR on Monocyte Subpopulations during Systemic Inflammation.” *Critical Care* 14 (2): R61. doi:10.1186/cc8959.
- Kimura, Kenta, Tokiko Isowa, Hideki Ohira, and Seikou Murashima. 2005. “Temporal Variation of Acute Stress Responses in Sympathetic Nervous and Immune Systems.” *Biological Psychology* 70 (2): 131–39. doi:10.1016/j.biopsycho.2004.12.006.

- Kin, Nicholas W., and Virginia M. Sanders. 2006. "It Takes Nerve to Tell T and B Cells What to Do." *Journal of Leukocyte Biology* 79 (6): 1093–1104. doi:10.1189/jlb.1105625.
- Kinjo, Yuki, Emmanuel Tupin, Douglass Wu, Masakazu Fujio, Raquel Garcia-Navarro, Mohammed Rafii-El-Idrissi Benhnia, Dirk M. Zajonc, et al. 2006. "Natural Killer T Cells Recognize Diacylglycerol Antigens from Pathogenic Bacteria." *Nature Immunology* 7 (9):978–86. <https://doi.org/10.1038/ni1380>.
- Klose, Christoph S. N., and David Artis. 2016. "Innate Lymphoid Cells as Regulators of Immunity, Inflammation and Tissue Homeostasis." *Nature Immunology* 17 (7): 765–74. doi:10.1038/ni.3489.
- Koch, Joachim, Alexander Steinle, Carsten Watzl, and Ofer Mandelboim. 2013. "Activating Natural Cytotoxicity Receptors of Natural Killer Cells in Cancer and Infection." *Trends in Immunology* 34 (4): 182–91. doi:10.1016/j.it.2013.01.003.
- Koozekanani, Said H., W. Michael Vise, Reza M. Hashemi, and Robert B. McGhee. 1976. "Possible Mechanisms for Observed Pathophysiological Variability in Experimental Spinal Cord Injury by the Method of Allen." *Journal of Neurosurgery* 44 (4): 429–34. doi:10.3171/jns.1976.44.4.0429.
- Krebs, Philippe, Elke Scandella, Bernhard Odermatt, and Burkhard Ludewig. 2005. "Rapid Functional Exhaustion and Deletion of CTL Following Immunization with Recombinant Adenovirus." *The Journal of Immunology* 174 (8): 4559–66. doi:10.4049/jimmunol.174.8.4559.
- Lafci, Gokhan, Hikmet Selcuk Gedik, Kemal Korkmaz, Havva Erdem, Omer Faruk Cicek, Osman Arikan Nacar, Levent Yildirim, Ertugrul Kaya, and Handan Ankarali. 2013. "Efficacy of Iloprost and Montelukast Combination on Spinal Cord Ischemia/reperfusion Injury in a Rat Model." *Journal of Cardiothoracic Surgery* 8 (April): 64. doi:10.1186/1749-8090-8-64.

- Laginha, Inês, Marcel A. Kopp, Claudia Druschel, Klaus-Dieter Schaser, Benedikt Brommer, Rick C. Hellmann, Ralf Watzlawick, et al. 2016. "Natural Killer (NK) Cell Functionality after Human Spinal Cord Injury (SCI): Protocol of a Prospective, Longitudinal Study." *BMC Neurology* 16 (September): 170. doi:10.1186/s12883-016-0681-5.
- Lalwani, Sanjeev, Parul Punia, Purva Mathur, Vivek Trikha, Gurudutta Satyarthee, and Mahesh C Misra. 2014. "Hospital Acquired Infections: Preventable Cause of Mortality in Spinal Cord Injury Patients." *Journal of Laboratory Physicians* 6 (1): 36–39. doi:10.4103/0974-2727.129089.
- Latchman, Yvette, Clive R. Wood, Tatyana Chernova, Divya Chaudhary, Madhuri Borde, Irene Chernova, Yoshiko Iwai, et al. 2001. "PD-L2 Is a Second Ligand for PD-1 and Inhibits T Cell Activation." *Nature Immunology* 2 (3):ni0301_261. <https://doi.org/10.1038/85330>.
- LaVela, Sherri L., Charlesnika T. Evans, Scott Miskevics, Jorge P. Parada, Michael Priebe, and Frances M. Weaver. 2007. "Long-Term Outcomes from Nosocomial Infections in Persons with Spinal Cord Injuries and Disorders." *American Journal of Infection Control* 35 (6): 393–400. doi:10.1016/j.ajic.2006.08.012.
- Ledbetter, J. A., J. B. Imboden, G. L. Schieven, L. S. Grosmaire, P. S. Rabinovitch, T. Lindsten, C. B. Thompson, and C. H. June. 1990. "CD28 Ligation in T-Cell Activation: Evidence for Two Signal Transduction Pathways." *Blood* 75 (7): 1531–39.
- Lederman, Michael M., Nicholas T. Funderburg, Rafick P. Sekaly, Nichole R. Klatt, and Peter W. Hunt. 2013. "Chapter Two - Residual Immune Dysregulation Syndrome in Treated HIV Infection." In *Advances in Immunology*, edited by Frederick W. Alt, 119:51–83. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124077072000023>.
- Lenschow, Deborah J., Theresa L. Walunas, and and Jeffrey A. Bluestone. 1996. "Cd28/B7 System of T Cell Costimulation." *Annual Review of Immunology* 14 (1): 233–58. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.233.

- Li, Qiurong, Chenyang Wang, Chun Tang, Qin He, Xiaofan Zhao, Ning Li, and Jieshou Li. 2015. "Successful Treatment of Severe Sepsis and Diarrhea after Vagotomy Utilizing Fecal Microbiota Transplantation: A Case Report." *Critical Care* 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0738-7>.
- Liao, Chia-Min, Michael I. Zimmer, and Chyung-Ru Wang. 2013. "The Functions of Type I and Type II Natural Killer T (NKT) Cells in Inflammatory Bowel Diseases." *Inflammatory Bowel Diseases* 19 (6): 1330–38. doi:10.1097/MIB.0b013e318280b1e3.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4):402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Long, Eric O, Hun Sik Kim, Dongfang Liu, Mary E Peterson, and Sumati Rajagopalan. 2013. "Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition." *Annual Review of Immunology* 31: 227–58. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075005.
- Lonjon, N., F. E. Perrin, M. Lonjon, C. Fattal, F. Segnarbieux, A. Privat, and L. Bauchet. 2012. "Les Lésions Médullaires Traumatiques : Épidémiologie et Perspectives." *Neurochirurgie* 58 (5): 293–99. doi:10.1016/j.neuchi.2012.06.003.
- Lucin, Kurt M., Virginia M. Sanders, T. Bucky Jones, William B. Malarkey, and Phillip G. Popovich. 2007. "Impaired Antibody Synthesis after Spinal Cord Injury Is Level-Dependent and Is Due to Sympathetic Nervous System Dysregulation." *Experimental Neurology* 207 (1): 75–84. doi:10.1016/j.expneurol.2007.05.019.
- Lucin, Kurt M., Virginia M. Sanders, and Phillip G. Popovich. 2009. "Stress Hormones Collaborate to Induce Lymphocyte Apoptosis after High Level Spinal Cord Injury." *Journal of Neurochemistry* 110 (5): 1409–21. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06232.x.

- MacKenzie, Ellen J. 1984. "Injury Severity Scales: Overview and Directions for Future Research." *The American Journal of Emergency Medicine* 2 (6): 537–49. doi:10.1016/0735-6757(84)90081-0.
- Marraco, Silvia A. Fuertes, Natalie J. Neubert, Grégory Verdeil, and Daniel E. Speiser. 2015. "Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion." *Frontiers in Immunology* 6. doi:10.3389/fimmu.2015.00310.
- Medzhitov, Ruslan, and Charles Jr. Janeway. 2000. "Innate Immunity." *New England Journal of Medicine* 343 (5): 338–44. doi:10.1056/NEJM200008033430506.
- Meisel, Christian, Jan M. Schwab, Konstantin Prass, Andreas Meisel, and Ulrich Dirnagl. 2005. "Central Nervous System Injury-Induced Immune Deficiency Syndrome." *Nature Reviews Neuroscience* 6 (10): 775–86. doi:10.1038/nrn1765.
- Meisel, Christian, Joerg C. Schefold, Rene Pschowski, Tycho Baumann, Katrin Hetzger, Jan Gregor, Steffen Weber-Carstens, et al. 2009. "Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor to Reverse Sepsis-Associated Immunosuppression: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Multicenter Trial." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180 (7): 640–48. doi:10.1164/rccm.200903-0363OC.
- Min, Sang Hyuk, Sang Hoon Lee, Hosup Shim, Jeong-Soo Park, Young Ii Lee, Hae-Won Kim, and Jung Keun Hyun. 2011. "Development of Complete Thoracic Spinal Cord Transection Model in Rats for Delayed Transplantation of Stem Cells." *Spine* 36 (3): E155-163. doi:10.1097/BRS.0b013e3181d8b92a.
- Monahan, Rachel, Adam Stein, Katie Gibbs, Matthew Bank, and Ona Bloom. 2015. "Circulating T Cell Subsets Are Altered in Individuals with Chronic Spinal Cord Injury." *Immunologic Research* 63 (1–3): 3–10. doi:10.1007/s12026-015-8698-1.
- Monneret, Guillaume, and Fabienne Venet. 2012. "A Rapidly Progressing Lymphocyte Exhaustion after Severe Sepsis." *Critical Care* 16 (4): 140. doi:10.1186/cc11416.

- Monneret, Guillaume, Morgane Gossez, and Fabienne Venet. 2016. "Sepsis in PD-1 Light." *Critical Care* 20. doi:10.1186/s13054-016-1370-x.
- Montgomerie, John Z. 1997. "Infections in Patients with Spinal Cord Injuries." *Clinical Infectious Diseases* 25 (6): 1285–90. doi:10.1086/516144.
- Morgan, A. S. 1992. "Risk Factors for Infection in the Trauma Patient." *Journal of the National Medical Association* 84 (12): 1019–23.
- Mrakovcic-Sutic, I., V. Sotosek Tokmadzic, G. Laskarin, H. Mahmutefendic, P. Lucin, Z. Zupan, and A. Sustic. 2010. "Early Changes in Frequency of Peripheral Blood Lymphocyte Subpopulations in Severe Traumatic Brain-Injured Patients." *Scandinavian Journal of Immunology* 72 (1): 57–65. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02407.x.
- Muehlstedt, Steven G., Mark Lyte, and Jorge L. Rodriguez. 2002. "Increased IL-10 Production and HLA-DR Suppression in the Lungs of Injured Patients Precede the Development of Nosocomial Pneumonia." *Shock (Augusta, Ga.)* 17 (6): 443–50.
- Muenzer, Jared T., Christopher G. Davis, Kathy Chang, Robert E. Schmidt, W. Michael Dunne, Craig M. Coopersmith, and Richard S. Hotchkiss. 2010. "Characterization and Modulation of the Immunosuppressive Phase of Sepsis." *Infection and Immunity* 78 (4): 1582–92. doi:10.1128/IAI.01213-09.
- Nagarajan, Niranjana A., and Mitchell Kronenberg. 2007. "Invariant NKT Cells Amplify the Innate Immune Response to Lipopolysaccharide." *The Journal of Immunology* 178 (5): 2706–13. doi:10.4049/jimmunol.178.5.2706.
- Nance, Dwight M., and Virginia M. Sanders. 2007. "Autonomic Innervation and Regulation of the Immune System (1987–2007)." *Brain, Behavior, and Immunity* 21 (6): 736–45. doi:10.1016/j.bbi.2007.03.008.

- Newton, Kim, and Vishva M. Dixit. 2012. "Signaling in Innate Immunity and Inflammation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (3): a006049. doi:10.1101/cshperspect.a006049.
- Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L. L. Moldawer. 2001. "Sepsis Syndromes: Understanding the Role of Innate and Acquired Immunity." *Shock (Augusta, Ga.)* 16 (2): 83–96.
- Ohigashi, Yuichiro, Masayuki Sho, Yukishige Yamada, Yoshikazu Tsurui, Kaoru Hamada, Naoya Ikeda, Takashi Mizuno, et al. 2005. "Clinical Significance of Programmed Death-1 Ligand-1 and Programmed Death-1 Ligand-2 Expression in Human Esophageal Cancer." *Clinical Cancer Research* 11 (8): 2947–53. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1469.
- Okazaki, Taku, and Tasuku Honjo. 2006. "The PD-1–PD-L Pathway in Immunological Tolerance." *Trends in Immunology* 27 (4):195–201. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.02.001>.
- O'Neill, Luke A. J., Douglas Golenbock, and Andrew G. Bowie. 2013. "The History of Toll-like Receptors — Redefining Innate Immunity." *Nature Reviews Immunology* 13 (6): 453–60. doi:10.1038/nri3446.
- Osuchowski, Marcin F., Kathy Welch, Javed Siddiqui, and Daniel G. Remick. 2006. "Circulating Cytokine/inhibitor Profiles Reshape the Understanding of the SIRS/CARS Continuum in Sepsis and Predict Mortality." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (3): 1967–74.
- Ott, Patrick A., F. Stephen Hodi, and Caroline Robert. 2013. "CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients." *Clinical Cancer Research* 19 (19): 5300–5309. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0143.
- Papia, G., B. A. McLellan, P. El-Helou, M. Louie, A. Rachlis, J. P. Szalai, and A. E. Simor. 1999. "Infection in Hospitalized Trauma Patients: Incidence, Risk Factors, and Complications." *The Journal of Trauma* 47 (5): 923–27.

- Piao, Min Sheng, Jung-Kil Lee, Jae-Won Jang, Soo-Han Kim, and Hyung-Seok Kim. 2009. "A Mouse Model of Photochemically Induced Spinal Cord Injury." *Journal of Korean Neurosurgical Society* 46 (5): 479–83. doi:10.3340/jkns.2009.46.5.479.
- Polk, H. C., W. G. Cheadle, D. H. Livingston, J. L. Rodriguez, K. M. Starko, A. E. Izu, H. S. Jaffe, and G. Sonnenfeld. 1992. "A Randomized Prospective Clinical Trial to Determine the Efficacy of Interferon-Gamma in Severely Injured Patients." *American Journal of Surgery* 163 (2): 191–96.
- Poll, T van der, J Jansen, E Endert, H P Sauerwein, and S J van Deventer. 1994. "Noradrenaline Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor and Interleukin 6 Production in Human Whole Blood." *Infection and Immunity* 62 (5): 2046–50.
- Popovich, Phillip, and Dana McTigue. 2009. "Damage Control in the Nervous System: Beware the Immune System in Spinal Cord Injury." *Nature Medicine* 15 (7): 736–37. doi:10.1038/nm0709-736.
- Rankin, Lucille, Joanna Groom, Lisa A Mielke, Cyril Seillet, and Gabrielle T Belz. 2013. "Diversity, Function, and Transcriptional Regulation of Gut Innate Lymphocytes." *Frontiers in Immunology* 4: 22. doi:10.3389/fimmu.2013.00022.
- Reignat, Stephanie, George J.M. Webster, David Brown, Graham S. Ogg, Abigail King, Suranjith L. Seneviratne, Geoff Dusheiko, Roger Williams, Mala K. Maini, and Antonio Bertoletti. 2002. "Escaping High Viral Load Exhaustion." *The Journal of Experimental Medicine* 195 (9): 1089–1101. doi:10.1084/jem.20011723.
- Rello, Jordi, Vicenç Ausina, Joan Castella, Alvar Net, and Guillem Prats. 1992. "Nosocomial Respiratory Tract Infections in Multiple Trauma Patients: Influence of Level of Consciousness with Implications for Therapy." *Chest* 102 (2): 525–29. doi:10.1378/chest.102.2.525.

- Riegger, Tino, Sabine Conrad, Kai Liu, Hermann J. Schluesener, Mahdi Adibzahdeh, and Jan M. Schwab. 2007. "Spinal Cord Injury-Induced Immune Depression Syndrome (SCI-IDS)." *European Journal of Neuroscience* 25 (6): 1743–47. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05447.x.
- Riegger, T., S. Conrad, H. J. Schluesener, H. -P. Kaps, A. Badke, C. Baron, J. Gerstein, K. Dietz, M. Abdizahdeh, and J. M. Schwab. 2009. "Immune Depression Syndrome Following Human Spinal Cord Injury (SCI): A Pilot Study." *Neuroscience, Brain - Immune Interactions in Acute and Chronic Brain Disorders*, 158 (3): 1194–99. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.08.021.
- Roquilly, Antoine, Laetitia Gautreau, Jean Pierre Segain, Pierre de Coppet, Véronique Sebillé, Cédric Jacqueline, Jocelyne Caillon, et al. 2010. "CpG-ODN and MPLA Prevent Mortality in a Murine Model of Post-Hemorrhage-Staphylococcus Aureus Pneumonia." *PloS One* 5 (10): e13228. doi:10.1371/journal.pone.0013228.
- Roquilly A, Mahe P, Seguin P, and et al. 2011. "Hydrocortisone Therapy for Patients with Multiple Trauma: The Randomized Controlled Hypolyte Study." *JAMA* 305 (12): 1201–9. doi:10.1001/jama.2011.360.
- Roquilly, Antoine, Alexis Broquet, Cedric Jacqueline, Laetitia Gautreau, Jean Pierre Segain, Pierre de Coppet, Jocelyne Caillon, Frédéric Altare, Regis Josien, and Karim Asehnoune. 2013. "Toll-like Receptor-4 Agonist in Post-Haemorrhage Pneumonia: Role of Dendritic and Natural Killer Cells." *The European Respiratory Journal* 42 (5): 1365–78. doi:10.1183/09031936.00152612.
- Roquilly, Antoine, Alexis Broquet, Cédric Jacqueline, Damien Masson, Jean Pierre Segain, Cecile Braudeau, Mickael Vourc'h, et al. 2014. "Hydrocortisone Prevents Immunosuppression by Interleukin-10+ Natural Killer Cells after Trauma-Hemorrhage." *Critical Care Medicine* 42 (12): e752-761. doi:10.1097/CCM.0000000000000658.
- Roquilly, Antoine, Emmanuel Marret, Edward Abraham, and Karim Asehnoune. 2015. "Pneumonia Prevention to Decrease Mortality in Intensive Care Unit: A Systematic Review

and Meta-Analysis.” *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 60 (1): 64–75. doi:10.1093/cid/ciu740.

Roquilly, Antoine, Gaëlle David, Raphael Cinotti, Mickaël Vourc’h, Helene Morin, Bertrand Rozec, Christelle Retière, and Karim Asehnoune. 2017. “Role of IL-12 in Overcoming the Low Responsiveness of NK Cells to Missing Self after Traumatic Brain Injury.” *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 177 (April):87–94. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.08.006>.

Rubio, Marie-Thérèse. 2013. “Rôle Des Lymphocytes NKT Invariants Dans L’allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques.” *Hématologie* 19 (2): 136–45. doi:10.1684/hma.2013.0794.

Saito, Koji, Toshihiro Wagatsuma, Hiroaki Toyama, Yutaka Ejima, Kunihiko Hoshi, Masakazu Shibusawa, Masato Kato, and Shin Kurosawa. 2008. “Sepsis Is Characterized by the Increases in Percentages of Circulating CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells and Plasma Levels of Soluble CD25.” *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 216 (1): 61–68. doi:10.1620/tjem.216.61.

Sanders, Virginia M., and Rainer H. Straub. 2002. “Norepinephrine, the β -Adrenergic Receptor, and Immunity.” *Brain, Behavior, and Immunity* 16 (4): 290–332. doi:10.1006/brbi.2001.0639.

Schedlowski, M, W Hosch, R Oberbeck, R J Benschop, R Jacobs, H R Raab, and R E Schmidt. 1996. “Catecholamines Modulate Human NK Cell Circulation and Function via Spleen-Independent Beta 2-Adrenergic Mechanisms.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 156 (1): 93–99.

Seifert, J. L., J. E. Bell, B. B. Elmer, D. J. Sucato, and M. I. Romero. 2011. “Characterization of a Novel Bidirectional Distraction Spinal Cord Injury Animal Model.” *Journal of Neuroscience Methods* 197 (1): 97–103. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.02.003.

Sezer, Nebahat, Selami Akkuş, and Fatma Gülçin Uğurlu. 2015. “Chronic Complications of Spinal Cord Injury.” *World Journal of Orthopedics* 6 (1): 24–33. doi:10.5312/wjo.v6.i1.24.

- Siah, S., R. Belefqih, M. Elouennass, F.E. Fouadi, and I. Ihrari. 2009. "L'Infection Nosocomiale En Reanimation Des Brules." *Annals of Burns and Fire Disasters* 22 (2): 72–78.
- Sivan, Ayelet, Leticia Corrales, Nathaniel Hubert, Jason B. Williams, Keston Aquino-Michaels, Zachary M. Earley, Franco W. Benyamin, et al. 2015. "Commensal Bifidobacterium Promotes Antitumor Immunity and Facilitates anti-PD-L1 Efficacy." *Science (New York, N.Y.)* 350 (6264):1084–89. <https://doi.org/10.1126/science.aac4255>.
- Shin, Haina, and E John Wherry. 2007. "CD8 T Cell Dysfunction during Chronic Viral Infection." *Current Opinion in Immunology, Host-pathogen interactions/Immunological Techniques*, 19 (4): 408–15. doi:10.1016/j.coi.2007.06.004.
- Sousa, Caetano Reis e. 2006. « Dendritic Cells in a Mature Age ». *Nature Reviews Immunology* 6 (6):476. <https://doi.org/10.1038/nri1845>.
- Spec, Andrej, Yuichiro Shindo, Carey-Ann D. Burnham, Strother Wilson, Enyo A. Ablordeppey, Evan R. Beiter, Katherine Chang, Anne M. Drewry, and Richard S. Hotchkiss. 2015. "T Cells from Patients with Candida Sepsis Display a Suppressive Immunophenotype." *Critical Care* 20. doi:10.1186/s13054-016-1182-z.
- Spits, Hergen, David Artis, Marco Colonna, Andreas Diefenbach, James P. Di Santo, Gerard Eberl, Shigeo Koyasu, et al. 2013. "Innate Lymphoid Cells — a Proposal for Uniform Nomenclature." *Nature Reviews Immunology* 13 (2): 145–49. doi:10.1038/nri3365.
- Strengell, Mari, Sampsa Matikainen, Jukka Sirén, Anne Lehtonen, Don Foster, Ilkka Julkunen, and Timo Sareneva. 2003. "IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN-Gamma Production in Human NK and T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (11):5464–69.
- Sznol, Mario, and Lieping Chen. 2013. "Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer." *Clinical Cancer Research* 19 (5): 1021–34. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2063.

- Takatori, Hiroaki, Yuka Kanno, Wendy T. Watford, Cristina M. Tato, Greta Weiss, Ivaylo I. Ivanov, Dan R. Littman, and John J. O’Shea. 2009. “Lymphoid Tissue Inducer–like Cells Are an Innate Source of IL-17 and IL-22.” *The Journal of Experimental Medicine* 206 (1): 35–41. doi:10.1084/jem.20072713.
- Thompson, R. Houston, Susan M. Kuntz, Bradley C. Leibovich, Haidong Dong, Christine M. Lohse, W. Scott Webster, Shomik Sengupta, et al. 2006. “Tumor B7-H1 Is Associated with Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma Patients with Long-Term Follow-Up.” *Cancer Research* 66 (7): 3381–85. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4303.
- Tinsley, Kevin W, Mitchell H Grayson, Paul E Swanson, Anne M Drewry, Katherine C Chang, Irene E Karl, and Richard S Hotchkiss. 2003. “Sepsis Induces Apoptosis and Profound Depletion of Splenic Interdigitating and Follicular Dendritic Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (2): 909–14.
- Topalian, Suzanne L., F. Stephen Hodi, Julie R. Brahmer, Scott N. Gettinger, David C. Smith, David F. McDermott, John D. Powderly, et al. 2012. “Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer.” *New England Journal of Medicine* 366 (26): 2443–54. doi:10.1056/NEJMoa1200690.
- Turina, Matthias, Ashley Dickinson, Sarah Gardner, and Hiram C. Polk Jr. 2006. “Monocyte HLA-DR and Interferon-Gamma Treatment in Severely Injured Patients—A Critical Reappraisal More Than a Decade Later.” *Journal of the American College of Surgeons* 203 (1): 73–81. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2006.03.010.
- Ulevitch, R. J., L. Kline, R. D. Schreiber, J. Pingel, I. Amaldi, W. Reith, et B. Mach. 1991. « Hyperexpression of interferon-gamma-induced MHC class II genes associated with reorganization of the cytoskeleton. » *The American Journal of Pathology* 139 (2):287-96.

- Van den Berg, Maayken E.L., Juan M. Castellote, Jesús de Pedro-Cuesta, and Ignacio Mahillo-Fernandez. 2010. "Survival after Spinal Cord Injury: A Systematic Review." *Journal of Neurotrauma* 27 (8): 1517–28. doi:10.1089/neu.2009.1138.
- Van der Poll, T, S M Coyle, K Barbosa, C C Braxton, and S F Lowry. 1996. "Epinephrine Inhibits Tumor Necrosis Factor-Alpha and Potentiates Interleukin 10 Production during Human Endotoxemia." *Journal of Clinical Investigation* 97 (3): 713–19.
- Venet, Fabienne, Alexandre Pachot, Anne-Lise Debard, Julien Bohé, Jacques Bienvenu, Alain Lepape, and Guillaume Monneret. 2004. "Increased Percentage of CD4+CD25+ Regulatory T Cells during Septic Shock Is due to the Decrease of CD4+CD25- Lymphocytes." *Critical Care Medicine* 32 (11): 2329–31.
- Vétizou, Marie, Jonathan M. Pitt, Romain Daillère, Patricia Lepage, Nadine Waldschmitt, Caroline Flament, Sylvie Rusakiewicz, et al. 2015. "Anticancer Immunotherapy by CTLA-4 Blockade Relies on the Gut Microbiota." *Science (New York, N.Y.)* 350 (6264):1079–84. <https://doi.org/10.1126/science.aad1329>.
- Vivier, Eric, and Sophie Ugolini. 2009. "Regulatory Natural Killer Cells: New Players in the IL-10 Anti-Inflammatory Response." *Cell Host & Microbe* 6 (6): 493–95. doi:10.1016/j.chom.2009.12.001.
- Vogel, Thorsten U., Todd M. Allen, John D. Altman, and David I. Watkins. 2001. "Functional Impairment of Simian Immunodeficiency Virus-Specific CD8+ T Cells during the Chronic Phase of Infection." *Journal of Virology* 75 (5): 2458–61. doi:10.1128/JVI.75.5.2458-2461.2001.
- Vourc'h, Mickael, Antoine Roquilly, Alexis Broquet, Gaele David, Philippe Hulin, Cedric Jacqueline, Jocelyne Caillon, Christelle Retiere, and Karim Asehnoune. 2017. "Exoenzyme T Plays a Pivotal Role in the IFN- γ Production after Pseudomonas Challenge in IL-12 Primed Natural Killer Cells." *Frontiers in Immunology* 8 (October). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01283>.

- Walzer, Thierry, Marc Dalod, Eric Vivier, and Laurence Zitvogel. 2005. "Natural Killer Cell–dendritic Cell Crosstalk in the Initiation of Immune Responses." *Expert Opinion on Biological Therapy* 5 (s1): S49–59. doi:10.1517/14712598.5.1.S49.
- Wan, Yisong Y. 2010. "Regulatory T Cells: Immune Suppression and beyond." *Cellular and Molecular Immunology* 7 (3): 204–10. doi:10.1038/cmi.2010.20.
- Wesselkamper, Scott C, Bryan L Eppert, Gregory T Motz, Gee W Lau, Daniel J Hassett, and Michael T Borchers. 2008. "NKG2D Is Critical for NK Cell Activation in Host Defense against *Pseudomonas Aeruginosa* Respiratory Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (8): 5481–89.
- Wherry, E. John, Joseph N. Blattman, Kaja Murali-Krishna, Robbert van der Most, and Rafi Ahmed. 2003. "Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment." *Journal of Virology* 77 (8): 4911–27. doi:10.1128/JVI.77.8.4911-4927.2003.
- Wherry, E. John. 2011. "T Cell Exhaustion." *Nature Immunology* 12 (6): 492–99. doi:10.1038/ni.2035.
- Woiciechowsky, Christian, Khusru Asadullah, Dirk Nestler, Beatrice Eberhardt, Cornelia Platzer, Britta Schöning, Frauke Glöckner, Wolfgang R. Lanksch, Hans-Dieter Volk, and Wolf-Dietrich Döcke. 1998. "Sympathetic Activation Triggers Systemic Interleukin-10 Release in Immunodepression Induced by Brain Injury." *Nature Medicine* 4 (7): 808–13. doi:10.1038/nm0798-808.
- Wong, Connie H Y, Craig N Jenne, Woo-Yong Lee, Caroline Léger, and Paul Kubes. 2011. "Functional Innervation of Hepatic iNKT Cells Is Immunosuppressive Following Stroke." *Science (New York, N.Y.)* 334 (6052): 101–5. doi:10.1126/science.1210301.
- Woo, Seng-Ryong, Meghan E. Turnis, Monica V. Goldberg, Jaishree Bankoti, Mark Selby, Christopher J. Nirschl, Matthew L. Bettini, et al. 2012. "Immune Inhibitory Molecules LAG-3

and PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function to Promote Tumoral Immune Escape.” *Cancer Research* 72 (4): 917–27. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1620.

Wu, Changping, Yibei Zhu, Jingting Jiang, Jiemin Zhao, Xue-Guang Zhang, and Ning Xu. 2006. “Immunohistochemical Localization of Programmed Death-1 Ligand-1 (PD-L1) in Gastric Carcinoma and Its Clinical Significance.” *Acta Histochemica* 108 (1): 19–24. doi:10.1016/j.acthis.2006.01.003.

Wyndaele, M., and J.-J. Wyndaele. 2006. “Incidence, Prevalence and Epidemiology of Spinal Cord Injury: What Learns a Worldwide Literature Survey?” *Spinal Cord* 44 (9): 523–29. doi:10.1038/sj.sc.3101893.

Yao, Anhui, Fangfang Liu, Kun Chen, Liang Tang, Ling Liu, Kun Zhang, Caiyong Yu, et al. 2014. “Programmed Death 1 Deficiency Induces the Polarization of Macrophages/microglia to the M1 Phenotype after Spinal Cord Injury in Mice.” *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 11 (3): 636–50. doi:10.1007/s13311-013-0254-x.

Yazdani, Reza, Mehri Sharifi, Aylar Saba Shirvan, Gholamreza Azizi, and Mazdak Ganjalikhani-Hakemi. 2015. “Characteristics of Innate Lymphoid Cells (ILCs) and Their Role in Immunological Disorders (an Update).” *Cellular Immunology* 298 (1):66–76. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.09.006>.

Yi, John S, Maureen A Cox, and Allan J Zajac. 2010. “T-Cell Exhaustion: Characteristics, Causes and Conversion.” *Immunology* 129 (4): 474–81. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x.

Yoshimura, S., J. Bondeson, B. M. Foxwell, F. M. Brennan, et M. Feldmann. 2001. « Effective Antigen Presentation by Dendritic Cells Is NF-KappaB Dependent: Coordinate Regulation of MHC, Co-Stimulatory Molecules and Cytokines ». *International Immunology* 13 (5):675-83.

- Zajac, Allan J., Joseph N. Blattman, Kaja Murali-Krishna, David J.D. Sourdive, M. Suresh, John D. Altman, and Rafi Ahmed. 1998. "Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function." *The Journal of Experimental Medicine* 188 (12): 2205–13.
- Zelinskyy, Gennadiy, Shelly J. Robertson, Simone Schimmer, Ronald J. Messer, Kim J. Hasenkrug, and Ulf Dittmer. 2005. "CD8+ T-Cell Dysfunction due to Cytolytic Granule Deficiency in Persistent Friend Retrovirus Infection." *Journal of Virology* 79 (16): 10619–26. doi:10.1128/JVI.79.16.10619-10626.2005.
- Zha, Ji, Annalise Smith, Samita Andreansky, Valerie Bracchi-Ricard, and John R. Bethea. 2014. "Chronic Thoracic Spinal Cord Injury Impairs CD8+ T-Cell Function by up-Regulating Programmed Cell Death-1 Expression." *Journal of Neuroinflammation* 11: 65. doi:10.1186/1742-2094-11-65.
- Zhang, D. P., F. L. Yan, H. Q. Xu, Y. X. Zhu, Y. Yin, and H. Q. Lu. 2009. "A Decrease of Human Leucocyte Antigen-DR Expression on Monocytes in Peripheral Blood Predicts Stroke-Associated Infection in Critically-Ill Patients with Acute Stroke." *European Journal of Neurology* 16 (4): 498–505. doi:10.1111/j.1468-1331.2008.02512.x.
- Zhang, Qin, Mustafa Raoof, Yu Chen, Yuka Sumi, Tolga Sursal, Wolfgang Junger, Karim Brohi, Kiyoshi Itagaki, and Carl J. Hauser. 2010. "Circulating Mitochondrial DAMPs Cause Inflammatory Responses to Injury." *Nature* 464 (7285): 104–7. doi:10.1038/nature08780.
- Zhang, Yi, Zhen Guan, Brenda Reader, Todd Shawler, Shweta Mandrekar-Colucci, Kun Huang, Zachary Weil, et al. 2013. "Autonomic Dysreflexia Causes Chronic Immune Suppression after Spinal Cord Injury." *The Journal of Neuroscience* 33 (32): 12970–81. doi:10.1523/JNEUROSCI.1974-13.2013.
- Zhang, Ning, Marong Fang, Haohao Chen, Fangming Gou, and Mingxing Ding. 2014. "Evaluation of Spinal Cord Injury Animal Models." *Neural Regeneration Research* 9 (22): 2008–12. doi:10.4103/1673-5374.143436

Article

Immunotherapy with anti-PD1 antibody improves outcome in a Mouse Model of Spinal Cord Injury Followed by *Staphylococcus aureus* Pneumonia

Tiphaine Ruggeri^{1,2}; Cédric Jacqueline, PhD¹; Xavier Ambrosi, MD¹; Alexis Broquet, PhD¹; Juliette Desfrancois⁴; Antoine Roquilly, MD, PhD^{1,3}; Frédéric Altare, PhD²; Karim Asehnoune, MD, PhD^{1,3}

1 Laboratoire EA 3826 "Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections", IRS2-Nantes Biotech, Nantes, France.

2 Centre régional de recherche en cancérologie Nantes/Angers INSERM UMR1232, Nantes, France.

3 Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Service anesthésie réanimation chirurgicale, Hôtel Dieu, Nantes, France.

4 Plate-forme Cytocell, Nantes, France.

Correspondence to: Karim Asehnoune, MD, PhD

Head of the Anaesthesia and Surgical Intensive Care Unit,

University Hospital of Nantes

32 Boulevard Jean Monnet (PTMC)

44093 Nantes, France

E-mail: karim.asehnoune@chu-nantes.fr

ABSTRACT

Objective: In patients with spinal cord injury (SCI), SCI-immune depression syndrome (SCI-IDS) induces pneumonia. We aimed to develop a new SCI-IDS mouse model and to test anti-PD-1 therapy.

Design: Experimental study

Setting: Research laboratory

Subjects: RjOrl: SWISS and BALB/cJ mice

Interventions: Mouse model of SCI-IDS followed by a methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) pneumonia. Lung injuries were assessed by histological analysis. Membrane markers and intracytoplasmic cytokines were assessed by flow cytometry. Cytokine production was assessed by quantitative polymerase chain reaction (mRNA), and ELISA (protein). Animals were treated with blocking anti-PD-1 antibodies (IP injection).

Measurements and Main Results: SCI mice were more susceptible to MSSA pneumonia (increased mortality rate). An early inflammatory response was observed in SCI mice characterized in lungs by a decreased % of aerated tissue, an increased production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α). In spleen, an increased expression of major histocompatibility complex class II (MHC-II) molecules on dendritic cells, and an increased production of pro-inflammatory cytokines (IL-12, IFN- γ) was observed. Following this pulmonary and systemic inflammation, SCI-IDS was observed in spleens as acknowledged by a decrease of spleen's weight, a lymphopenia, a decrease of MHC-II expression on dendritic cells. An increase of IL-10 production, and the increase of a cell exhaustion marker expression, programmed cell death 1 receptor (PD-1) on T-cell were also observed. Blockade of PD-1 molecules, improved survival of SCI infected mice and enhanced IFN- γ production by NKT cells as well as number of viable CD4⁺ T cells.

Conclusions: this model of SCI in mice mimics a clinical scenario rendering animals prone to a secondary pneumonia. We show for the first time an acute T-cell exhaustion-like phenomenon following an initial inflammatory response. Finally, inhibition of exhaustion pathway should be considered as a new therapeutic option to overcome SCI-IDS and to decrease the rate of nosocomial pneumonia.

Keywords: spinal cord injury; trauma; immunosuppression; immunotherapy; programmed cell death 1 receptor; PD-1

Total words count: 2992

Total words count in abstract: 298

Total number of figures: 5

INTRODUCTION

Nosocomial infections are the leading causes of death in the post-acute phase following spinal cord injury (SCI) (1). SCI induces a severe initial systemic inflammatory response followed by an intense period of immunosuppression which is recognized as an independent risk factor for infection (1, 2). Studies in human and rodent SCI models have already investigated the specific immunosuppression encountered after SCI which is called SCI-induced deficiency syndrome (SCI-IDS) (3). However, few data have been published concerning the consequences of SCI-IDS especially in regard to the leading cause of infectious complications which is bacterial pneumonia (4). SCI-IDS is characterised by the following features: decreased ability of monocytes to present antigens as assessed by the loss of membrane expression of MHC-II molecules (3, 5), lymphopenia (6, 7) and increased anti-inflammatory cytokine IL-10 production (8). Recently, it was also demonstrated that SCI-IDS may involve an up-regulation of inhibitory proteins with an increased membrane expression of programmed cell death 1 receptor (PD-1, exhaustion marker) in chronic SCI (9).

PD-1 is a member of the B7-CD28 family (10) which interacts with two ligands PD-L1 and PD-L2 (11) to inhibit T-cell activation and proliferation (12).

Blocking PD-1 and PD-L1 or 2 could be a new treatment to boost immunity in patients hospitalized in intensive care units (13, 14). Indeed, anti-PD-1 antibody was able to reverse sepsis-induced immunosuppression and to improve survival in bacterial and fungal sepsis mouse models (15, 16).

In the present report, we describe a new easy-to-perform model of SCI-IDS with subsequent bacterial infection to mimic a clinical scenario and propose new therapeutic options. Finally, we evaluated whether blocking antibodies against PD-1 administered after SCI could restore immune homeostasis and enhance the survival rate.

MATERIALS AND METHODS

Full details are available in the supplemental material.

Animals

SWISS and BALBc female mice (17-20g) were purchased from Janvier Laboratory (France). The mice were maintained on a 12h light/dark cycle with free access to food and water.

Spinal Cord Injury (SCI) and Sham Procedure

A medullar section was mechanically performed between the T3-T9 vertebrae. Except for the medullar section, Sham mice underwent the same surgical procedure as the SCI mice. The skin was closed by applying simple interrupted sutures. All of the procedures were performed under aseptic surgical conditions.

Pneumonia Procedure

Pneumonia was induced by methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) (ATCC 29213 strain) as previously described (17, 18), calibrated at 7.0 McF and concentrated ten times. Bacterial concentration was controlled by quantitative culture.

Histological Analysis

Lungs were removed and immediately placed in 4% formalin. Tissues were stained with HPS and analysed by NDP view software. For each histological section, eight fields of view were collected and analysed by SIOX (Single Integrative Object Extraction) with Fiji software (www.fiji.sc). The tissue signal (foreground) was extracted from the alveolar space and blood vessels (background) using Fiji. The tissue percentage was calculated from the number of tissue pixels as a percentage of the total image pixels (17, 19).

Bacterial Growth and Dissemination

Lungs and spleen were mechanically homogenised in 1 ml of sterile isotonic saline. Serial dilutions were performed and cultured at 37°C on Chapman medium. After 48 hours of incubation, colonies were counted and results expressed as log₁₀ CFU per gram/organ.

Lung and Spleen Homogenates for ELISA and Determination of Cytokine Levels

Homogenates were prepared as previously described (19). TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10, (eBioscience affymetrix, Paris, France) and KC (R&D Systems, Lille, France) were quantified by ELISA. Protein concentration in each sample was determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL).

RT-Polymerase Chain Reaction

Splenic CD11c cells were isolated on separation magnetic columns (Miltenyi Biotec, Paris, France). The total RNA of splenic CD11c⁺ cells was isolated in Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Spleen Cell Suspension

Splenic cells were isolated as previously described (19).

Flow Cytometry Antibodies and Phenotypic Analysis

All sample were prepared as previously described (19). BALBc mice were used only for MHC-II experiments. Cells were analysed using the BD LSRII flow cytometer and were quantified using Flow Jo software (Treestar, Ashland, OR, USA). Dead cells were excluded by fixable viability dye eFluor780 antibody from eBioscience.

Anti-PD-1 Antibody Immunotherapy

Anti-PD-1 antibody or rat Ig2a isotype were used at 0.2 mg/kg for all of the experiments except for two survival experiments at 10 mg/kg (Clone RMP1-14 BioXCell, Euromedex, Souffelweyersheim, France). Antibodies were administered by intraperitoneal route once a day for 48 hours after surgical trauma.

RESULTS

Clinical Evaluation of SCI in Mice

A MRI of a normal spinal cord (Sham mouse without dislocation) is presented in Supplemental Fig. S1A. SCI mice were subjected to a dislocation between the T3 and T9 vertebrae, supported by the presence of a haematoma in the MRI shown in Supplemental Fig. S1B. Clinical success of the procedure for SCI was defined by the existence of bilateral paraplegia.

SCI Increases the Mortality rate of MSSA Pneumonia

Two different time points (Days 1 and 3) were studied. Mouse survival was determined for 10 days (240 hours) after injury (Fig. 1). A significant difference in the mortality rate between the Sham and SCI groups (20% and 50% respectively) was observed when MSSA pneumonia was induced 3 days after SCI (Fig. 1B). Considering these results, MSSA pneumonia was always induced 3 days after SCI in subsequent experiments.

SCI Induces an Early Inflammatory Response

SCI Alone does not modify the Inflammatory Response in Lungs

The aerated lung (Supplemental Fig. S2A) was not different between the Sham and SCI groups (Fig. 2A, left panel). TNF- α , IL-1 β and KC were under the detection limit of the ELISA kit in the Sham and SCI groups (data not shown).

SCI Increases the Inflammatory Response in Lungs after MSSA Pneumonia

After MSSA pneumonia, the aerated lung was reduced at 24 hours in SCI compared with the Sham mice (Fig. 2A, right panel), and this was not correlated with a bacterial burden (Supplemental Fig. S2B). There was a significant increase of TNF- α in SCI mice compared with the Sham group 6 hours after MSSA infection (Fig. 2B). IL-1 β and KC were not different

in the Sham and SCI groups (data not shown). These data indicate that SCI acts as a trigger that increases the inflammatory response after secondary MSSA pneumonia.

SCI Increases the Inflammatory Response in the Spleen

The formation of peptide-MHC class II complex is boosted by inflammatory stimuli that induce the maturation of dendritic cells (DC) (21). In non-infected animals, the expression of MHC-II molecules increased on splenic DC in SCI compared with the Sham mice (Fig. 3A, the gating strategy is presented in Supplemental Fig. S3). IL-12 mRNA was also increased in SCI compared with the Sham group 6 hours after surgery (Supplemental Fig. S4). Following this increase in IL-12, IFN- γ mRNA was significantly higher at H24 in SCI compared with the Sham group (Fig. 3B).

The Initial pro-inflammatory Response is followed by a SCI-IDS in Spleens after SCI

Immunosuppression Response after SCI

We have previously described the role of IL-10 in the post-traumatic dysfunction of NK cell/DC interactions in acute conditions (22). We have now found that IL-10 levels (mRNA and protein) were significantly upregulated at H48 in the SCI group (Supplemental Fig. S5A, and Fig. 4A). SCI spleen weight (Supplemental Fig. S5B) as well as spleen size (Supplemental Fig. S5C) and the number of viable splenic T cells were decreased 72 hours after SCI (Supplemental Fig. S5D). Overall, these results show an impairment of immune functions.

Consequences of SCI-induced Immunosuppression after MSSA-induced Pneumonia

SCI Induces a Shift toward Higher IL-10 Production and a Decreased Expression of MHC-II Molecules on Splenic DC Cells

To further understand the role of the SCI-IDS, IFN- γ and IL-10 protein production was also analysed in total spleen after MSSA infection. The level of IL-10 was significantly higher whereas the production of IFN- γ remained dramatically low in the SCI group compared with the Sham group from H48 to H120 (Supplemental Fig. S6A and B).

After MSSA pneumonia, the expression of MHC-class II molecules was dramatically decreased on splenic DC cells in SCI compared with Sham mice (Supplemental Fig. S6C).

T-cell Exhaustion after SCI

Activation of exhaustion pathways was first described in chronic virus infections and in cancer (23, 24), conditions in which a chronic inflammatory response is observed. An initial inflammatory response was also noted in our experiments (see above). We therefore evaluated T-cell exhaustion in our model.

PD-1 is Upregulated on Splenic T Lymphocytes

The percentages of T lymphocytes and NK cells in lymphocyte cells were not different between the SCI and Sham groups (data not shown). Afterwards, we studied the expression of markers for maturation (KLRG1), activation (CD69) and exhaustion (PD-1), and no differences were observed on NK cells (data not shown).

In CD3⁺ T-cells, KLRG1 expression (maturation marker) was not different in the Sham and SCI groups (data not shown). Nevertheless, CD69 expression (activation marker) on T-cells increased significantly in the SCI group (Supplemental Fig. S5E). Finally, and as recently demonstrated in chronic thoracic SCI (9), the percentage of splenic T lymphocytes expressing PD-1 significantly increased in the SCI mice (Fig. 4B).

Immunotherapy by anti-PD-1 Antibody Improves Outcome

Blocking PD-1 Pathway Decreases Mortality in SCI Mice

Since PD-1 was upregulated on T lymphocytes after SCI, we investigated the effect of a blocking anti-PD-1 antibody (Supplemental Fig. S7A). We first used a dose of 200 μ g per mouse (10 mg/kg) (15, 16), and there was a trend toward a lower survival rate in the SCI-treated mice compared with the SCI mice left untreated (Fig. 5A). With a lower concentration (25) of anti-PD-1 antibody (4 μ g per mouse, 0.2 mg/kg), treatment led to a significant improvement in the survival rate of the SCI mice (Fig. 5A).

Anti-PD-1 Antibody Increased the % of IFN- γ ⁺ NKT Cells in SCI Mice

The percentage of CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ NKT cells among viable T and NKT cells respectively (the gating strategy is presented in Supplemental Fig. S8) was enhanced with anti-PD-1 treatment (Supplemental Fig. S7B and Fig. 5B). The treatment had no effects on the other cell populations (data not shown). Finally, the percentage of IFN- γ ⁺ NKT cells increased significantly in the SCI mice treated with anti-PD-1 antibody (Supplemental Fig. S7C), and there was also a trend toward an increase in IFN- γ ⁺ CD8⁺ NKT cells (Supplemental Fig. S7D).

DISCUSSION

In the present study, we validated a new SCI-IDS mouse model mimicking the clinical scenario of an SCI patient. Our results provided evidence that the expression of PD-1 increased on T lymphocytes after SCI. Blockade of PD-1 molecules during SCI-IDS improved the survival of the SCI-infected mice and restored IFN- γ production by NKT cells.

Since SCI patients are generally healthy and young, they should mount a robust immune response to injuries but it is now widely accepted that they display an SCI-IDS consecutive to injury (5). SCI-IDS has been proposed as a compensatory response to protect the spinal cord from the deleterious effects of an overwhelming local inflammatory response. However, excessive activation of the anti-inflammatory pathways increases susceptibility to nosocomial pneumonia, one of the leading cause of death and of poor neurological outcome after SCI (26). Few studies have documented the mechanisms and patterns of this specific complication.

The sympathetic nervous system (SNS) can regulate the functions of the immune system through the release of norepinephrine (27). In the present experiments, atrophy of the spleen was observed in all of the animals, suggesting that SCI was performed near T3 rather than at the T9 level. Indeed, no spleen atrophy was observed at the T9 level in a mouse model of SCI, contrary to the T3 level (1).

A rapid and dramatic decrease in monocytes, DC, T and B lymphocytes was demonstrated in the SCI patients within 24 hours after SCI (5). These alterations were observed for at least 1 week, the period in which we and others observed bacterial pneumonia in SCI patients (4, 28). Our model should be close to the clinical situation since we observed a SCI-IDS (down-regulation of MHC Class II molecule, lymphopenia, increased IL-10, increased expression of PD-1, high susceptibility to pneumonia).

The first studies on T-cell exhaustion were performed during chronic infection with LCMV or HIV, where PD-1 is upregulated on CD8⁺ T-cells and T-cells become highly sensitive to apoptosis whereas they alter their capacity to proliferate (29, 30). T-cell exhaustion is therefore a process in which the T-cells lose their ability to kill cancer cells or pathogen-infected cells. More specifically, T-cell exhaustion is characterised by a downregulation of IL-2, IFN- γ and TNF- α production, and an upregulation of the inhibitor molecules expression such as PD-1 and lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) in a hierarchical manner (31). It has already been demonstrated both in sepsis patients (32) and in an SCI mouse model (9) that PD-1 is up-regulated on splenic T lymphocytes. Another study in a mouse model of SCI showed that a PD-1 deficiency induced the polarization of macrophages/microglia to the M1 phenotype (33). It is important to consider that increased expression of PD-1 on T cells occurs in circumstances for which a chronic antigen stimulation leading to inflammatory response such as viral infection or cancer is present. In accordance with this hypothesis, we first found an initial inflammatory response in the lungs and DCs of SCI mice.

Immunotherapy against "exhaustion molecules" i.e. PD-1, PD-L1 or CTLA-4 was recently used with success in cancer (34, 35) and, it is now widely accepted that blockade of exhaustion molecules expressed on the cell membrane may restore T-cell functions. This feature appears to be clinically relevant in our murine model since specific blockade of PD-1 improved the outcome of mice with SCI complicated by MSSA pneumonia.

In the context of ICU pathologies, anti-PD-1 antibodies reversed immune dysfunction in a CLP sepsis model (15) and in a fungal sepsis model (16). The present study complements the work of Brahmandam et al. who noted that anti-PD-1 antibody improved the survival rate in a mouse model of sepsis. With an injection of 10mg/kg of anti-PD-1 antibody per mouse

(15), the mortality rate was higher in SCI mice than in mice left untreated. Survival was improved when the anti-PD-1 antibody concentration was reduced fifty times (25). These results show the importance of the dose used and underline the fact that blocking immune checkpoint may lead to severe side effects (36).

Interestingly, our data suggest for the first time that splenic NKT cells are the major producer of IFN- γ following anti-PD-1 antibody therapy which is essential for monocyte and macrophage functions. Considering their fast activation and recruitment, innate lymphoid cells (ILCs) as NKT cells are primarily involved in the defence of the host against acute stresses including CNS injuries and infections (37, 38). NKT cells present a repertoire of T-cell receptors which is CD1d-restricted. NKT cells reside and patrol in the vasculature of the spleen and liver in mouse (37). When stimulating NKT cells, *in vivo*, these cells can produce large amounts of IFN- γ . Considering the intravascular localization of NKT, these cells are good candidates to detect distant tissue injury and to participate in systemic immunomodulation (39). In this setting, Wong et al. demonstrated in a mouse model that iNKT cells are critically involved in the systemic immunosuppression following stroke (40). The current results confirm the importance of NKT cells by showing that anti-PD-1 antibodies improve the survival rate of SCI-IDS treated mice probably through an enhancement of IFN- γ^+ NKT cells and of CD4 $^+$ T cells. IFN- γ is a critical modulator in both innate and adaptive immune responses including MHC-I and MHC-II antigen presentation and CD4 $^+$ T-helper response. Moreover, IFN- γ was an important mediator for defence against *Staphylococcus pneumonia* in a mouse model of pneumonia (41). The alteration of IFN- γ production may therefore contribute to the impaired capacities of SCI mice to fight against infection, and we propose that blocking PD-1 antibodies will restore the capacities of NKT cells to produce IFN- γ .

Conclusions

The present results show that blockade of the negative co-stimulatory molecule PD-1 improved survival in a spinal cord injury mouse model probably through an increase of IFN- γ production by NKT cells. If studies in different models of trauma show its efficacy, clinical trials with anti-PD-1 antibody should be conducted in trauma patients in an attempt to decrease the rate of secondary bacterial pneumonia, a major cause of morbidity and mortality after SCI.

Acknowledgements

We thank Nadège Marec of Cytocell Platform for her help in flow cytometry. We also thank Myriam Robard and her group of MicroPICell Platform for all histological sections.

REFERENCES

1. Brommer B, Engel O, Kopp MA, et al: Spinal Cord Injury-Induced Immune Deficiency Syndrome Enhances Infection Susceptibility Dependent on Lesion Level. *Brain* 2016; 139: 692–707.
2. Held KS, and Lane TE: Spinal Cord Injury, Immunodepression, and Antigenic Challenge. *Seminars in Immunology* 2014; 26: 415–20.
3. Riegger T, Conrad S, Liu K, et al: Spinal Cord Injury-Induced Immune Depression Syndrome (SCI-IDS). *European Journal of Neuroscience* 2007; 25: 1743–47.
4. Roquilly A, Seguin P, Mimoz O, et al: Risk Factors for Prolonged Duration of Mechanical Ventilation in Acute Traumatic Tetraplegic Patients--a Retrospective Cohort Study. *Journal of Critical Care* 2014; 29: 313.e7-13.
5. Riegger T, Conrad S, Schluesener HJ, et al: Immune Depression Syndrome Following Human Spinal Cord Injury (SCI): A Pilot Study. *Neuroscience* 2009; 158: 1194–99.
6. Lucin KM, Sanders VM, Jones TB, et al: Impaired Antibody Synthesis after Spinal Cord Injury Is Level-Dependent and Is Due to Sympathetic Nervous System Dysregulation. *Experimental Neurology* 2007; 207: 75–84.
7. Zhang Y, Guan Z, Reader B, et al: Autonomic Dysreflexia Causes Chronic Immune Suppression after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience* 2013; 33: 12970–81.
8. Muehlstedt SG, Lyte M, and Rodriguez JL: Increased IL-10 Production and HLA-DR Suppression in the Lungs of Injured Patients Precede the Development of Nosocomial Pneumonia. *Shock* 2002; 17: 443–50.
9. Zha J, Smith A, Andreansky S, et al: Chronic Thoracic Spinal Cord Injury Impairs CD8+ T-Cell Function by up-Regulating Programmed Cell Death-1 Expression. *Journal of Neuroinflammation* 2014; 11: 65.

10. Sharpe AH, and Freeman GJ: The B7–CD28 Superfamily. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 116–26.
11. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al: PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology* 2008; 26: 677–704.
12. Parry RV, Chemnitz J M, Frauwirth K A, et al: CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25: 9543–53.
13. Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, et al: The New Normal: Immunomodulatory Agents against Sepsis Immune Suppression. *Trends in Molecular Medicine* 2014; 20: 224–33.
14. Hotchkiss RS, Monneret G, and Payen D: Immunosuppression in Sepsis: A Novel Understanding of the Disorder and a New Therapeutic Approach. *The Lancet Infectious Diseases* 2013; 13: 260–68.
15. Brahmamdam P, Inoue S, Unsinger J, et al: Delayed Administration of Anti-PD-1 Antibody Reverses Immune Dysfunction and Improves Survival during Sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 2010; 88: 233–40.
16. Chang KC, Burnham CA, Compton SM, et al: Blockade Ofthe Negative Co-Stimulatory Molecules PD-1 and CTLA-4 Improves Survival in Primary and Secondary Fungal Sepsis. *Critical Care* 2013; 17: R85.
17. Jacqueline C, Broquet A, Roquilly A, et al: Linezolid Dampens Neutrophil-Mediated Inflammation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*–Induced Pneumonia and Protects the Lung of Associated Damages. *Journal of Infectious Diseases* 2014; 210: 814–23.

18. Roquilly A, Gautreau L, Segain JP, et al: CpG-ODN and MPLA Prevent Mortality in a Murine Model of Post-Hemorrhage-Staphylococcus Aureus Pneumonia. *PloS One* 2010; 5: e13228.
19. Broquet A, Roquilly A, Jacqueline C, et al: Depletion of Natural Killer Cells Increases Mice Susceptibility in a Pseudomonas Aeruginosa Pneumonia Model. *Critical Care Medicine* 2014; 42: e441-450.
20. Livak KJ, and Schmittgen TD: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402–8.
21. Cella M, Engering A, Pinet V, et al: Inflammatory Stimuli Induce Accumulation of MHC Class II Complexes on Dendritic Cells. *Nature* 1997; 388: 782–87.
22. Roquilly A, Broquet A, Jacqueline C, et al: Hydrocortisone Prevents Immunosuppression by Interleukin-10+ Natural Killer Cells after Trauma-Hemorrhage. *Critical Care Medicine* 2014; 42: e752-761.
23. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al: Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *The Journal of Experimental Medicine* 1998; 188: 2205–13.
24. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al: Coregulation of CD8+ T Cell Exhaustion by Multiple Inhibitory Receptors during Chronic Viral Infection. *Nature Immunology* 2009; 10: 29–37.
25. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al: Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine* 2012; 366: 2443–54.
26. Failli V, Kopp MA, Gericke C, et al: Functional Neurological Recovery after Spinal Cord Injury Is Impaired in Patients with Infections. *Brain* 2012; 135: 3238–50.

27. Meisel C, Schwab JM, Prass K, et al: Central Nervous System Injury-Induced Immune Deficiency Syndrome. *Nature Reviews Neuroscience* 2005; 6: 775–86.
28. Cardozo CP: Respiratory Complications of Spinal Cord Injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine* 2007; 30: 307-8.
29. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al: Restoring Function in Exhausted CD8 T Cells during Chronic Viral Infection. *Nature* 2006; 439: 682–87.
30. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al: PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated with T-Cell Exhaustion and Disease Progression. *Nature* 2006; 443: 350–54.
31. Wherry EJ: T Cell Exhaustion. *Nature Immunology* 2011; 12: 492–99.
32. Boomer JS, To K, Chang KC, et al: Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2011; 306: 2594–2605.
33. Yao A, Liu F, Chen K, et al: Programmed Death 1 Deficiency Induces the Polarization of Macrophages/Microglia to the M1 Phenotype after Spinal Cord Injury in Mice. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2014; 11: 636–50.
34. Ramelyte E, Schindler SA, and Dummer R: The Safety of Anti PD-1 Therapeutics for the Treatment of Melanoma. *Expert Opinion on Drug Safety* 2017; 16: 41–53.
35. Ott PA, Hodi FS, and Robert C: CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients. *Clinical Cancer Research* 2013; 19: 5300–5309.
36. Villadolid J, and Amin A: Immune Checkpoint Inhibitors in Clinical Practice: Update on Management of Immune-Related Toxicities. *Translational Lung Cancer Research* 2015; 4: 560–75.

37. Godfrey DI, Stankovic S, and Baxter AG: Raising the NKT Cell Family. *Nature Immunology* 2010; 11: 197–206.
38. Ivanov S, Paget C, and Trottein F: Role of Non-Conventional T Lymphocytes in Respiratory Infections: The Case of the Pneumococcus. *PLOS Pathogens* 2014; 10: e1004300.
39. Paget C, and Trottein F: Role of Type 1 Natural Killer T Cells in Pulmonary Immunity. *Mucosal Immunology* 2013; 6: 1054–67.
40. Wong CHY, Jenne CN, Lee WY, et al: Functional Innervation of Hepatic iNKT Cells Is Immunosuppressive Following Stroke. *Science* 2011; 334:101–5.
41. Yamada M, Gomez JC, Chugh PE, et al: Interferon- γ Production by Neutrophils during Bacterial Pneumonia in Mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2011; 183: 1391–1401.

Legends of figures

Figure 1: Survival of Spinal Cord Injury mice after MSSA pneumonia. (A) Survival of SCI animals, MSSA pneumonia induced 1 day after SCI. (B) MSSA pneumonia induced 3 days after SCI. Data are representative of three independent experiments (each group, n = 10). Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. (B) Right panel, * $P = 0.04$ log-rank test.

Figure 2: Lung inflammation after MSSA pneumonia. (A) Percentage of aerated lung non-infected mice 24 hours and 48 hours after surgery, and MSSA-infected mice 24 hours and 48 hours after infection (corresponding to H96 and H120 after surgery respectively). n = 8 fields per mouse (3-5 animals/group). (B) TNF- α production during MSSA-induced pneumonia at H6, H24, and H48 post-infection. Data are representative of two independent experiments (each group, n = 5). Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; ns, not significant. (A) *** $P = 0.0002$ and (B) * $P = 0.0292$ Mann-Whitney non-parametric test; (B) #### $P = 0.0006$ Kruskal-Wallis non-parametric test;

Figure 3: Inflammatory response in spleen of non-infected SCI mice. (A) Geometric Mean Fluorescent Intensity (gMFI) of MHC-II molecules on splenic CD11c^{high} MHC-II⁺ dendritic cells in non-infected Sham and SCI mice, H16 after surgery (each group, n = 6). (B) mRNA expression of IFN- γ in Sham and SCI mice at H6, H24 and H48 after surgery (each group, n = 3). Data are representative of three independent experiments. Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion; MHC-II, Major Histocompatibility Complex class II

molecule. (A) $**P = 0.0025$ and (B) $**P = 0.0095$ Mann-Whitney non-parametric test; (B) $####P < 0.0001$ Kruskal-Wallis non-parametric test; (B) $*P < 0.05$ & $**P < 0.01$ Post-hoc Dunn's test for comparison between 2 groups.

Figure 4: Markers of SCI-IDS in spleen of non-infected SCI animals. (A) IL-10 production in the spleens of non-infected Sham and SCI mice at H24, H48, H72, H96 and H120 after surgery (each group, $n = 6$). (B) Percentage of PD1⁺ T-cells, in Sham and SCI mice. $n = 9-12$ in Sham and SCI groups. Data are representative of two independent experiments. Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion. (A) $**P = 0.0022$ and (B) PD-1 $***P = 0.0010$ Mann-Whitney non-parametric test; (A) $##P = 0.0011$ for Sham group and $##P = 0.0066$ for SCI group with Kruskal-Wallis non-parametric test.

Figure 5: Survival of mice treated with anti-PD-1 antibody and effects of immunotherapy on splenic Natural Killer T lymphocytes (NKT). (A) Susceptibility of SCI mice treated with anti-PD-1 or isotype control to MSSA infection with high dose of antibody with 10mg/kg (200 μ g per mouse) or low dose with 0.2mg/kg (4 μ g per mouse). Each group, $n = 10$. (B) Percentage of viable splenic CD8⁺ NKT cells, among NKT cells, in Sham and SCI non-infected mice with anti-PD-1 or isotype control antibody 72 hours after surgery (each group, $n = 6$) Data are representative of two independent experiments. Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. (A) At high dose $P = 0.0619$, and at low dose $*P = 0.0220$ log-rank test; (B) $**P = 0.0093$ Mann-Whitney non-parametric test.

Supplemental material

Supplemental Figure S1: Magnetic resonance imaging (MRI) of Sham and SCI mice (A)

MRI of Sham mouse 72 hours after the surgical procedure without SCI, (B) MRI of a SCI mouse.

Supplemental Figure S2: Lung and bacteria burden after MSSA pneumonia. (A) Lung

histopathologic examination of SCI mice, non-infected and infected by MSSA (10X, HPS staining); Slides were analysed by SIOX with Fiji software. (B) Bacterial loads in MSSA-infected lungs at 24 hours, 48 hours and 96 hours after infection. Data are representative of two independent experiments (each group, n = 5). Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; ns, not significant. (B) ## $P = 0.0013$ & ### $P = 0.0005$ Kruskal-Wallis non-parametric test; (B) ** $P < 0.01$ Post-hoc Dunn's test for comparison between 2 groups.

Supplemental Figure S3: Splenic CD11c^{high} MHC-II⁺ Dendritic Cells gating strategy. (A)

Gating of splenic CD11c^{high} MHC-II⁺ DC cells. Left to the right: Splenocyte-cell dot plot; Single-cell dot plot; Viability-cell dot plot; Lineage neg CD3⁻ NK1.1⁻ B220⁻ dot plot; CD11c MHC-II dot plot.

Supplemental Figure S4: mRNA relative expression of IL-12 in spleen of non-infected

SCI mice. (A) mRNA expression of IL-12 in Sham and SCI mice at H6, H24 and H48 after surgery (each group, n = 3). Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion. (A) * $P < 0.05$ Mann-Whitney non-parametric test; (A) ns (not significant) with Kruskal-Wallis non-parametric test.

Supplemental Figure S5: Supplemental Markers of SCI-IDS in spleen of non-infected SCI animals. (A) mRNA expression of IL-10 in Sham and SCI mice at H6, H24 and H48 after surgery (each group, n = 3). (B) Spleen weight of non-infected Sham and SCI mice at H24, H48, H72 and H96 after surgery (each group, n = 10). (C) Size of spleens of non-infected Sham and SCI mice 72 hours after surgery. (D) Splenic viability of CD3⁺ T lymphocytes at 72 hours after surgery, without infection (each group, n = 6). (E) Percentage of CD69⁺ T-cells in Sham and SCI mice. n = 9-12 in Sham and SCI groups. Data are representative of two independent experiments. Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion; MHC-II, Major Histocompatibility Complex class II molecule; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. (A) **P* = 0.0286 (B) *****P* < 0.0001 (D) ***P* = 0.0022 (E) CD69 ***P* = 0.0013, Mann-Whitney non-parametric test; (A) ns (not significant) for Sham group and ###*P* = 0.0012 for SCI group ns (B) ns for Sham group and #####*P* < 0.0001 for SCI group with Kruskal-Wallis non-parametric test.

Supplemental Figure S6: MHC-II expression and production of IL-10 and IFN- γ in spleen after MSSA pneumonia. (A) IL-10 production in spleen of Sham and SCI MSSA-infected mice at H6, H24, and H48 (each group, n = 10). (B) IFN- γ production in spleen of Sham and SCI MSSA-infected mice at H6, H24, and H48 (each group, n = 10) (C) Geometric Mean Fluorescent Intensity (gMFI) of MHC-II on splenic CD11c^{high} MHC-II⁺ dendritic cells (DC) in Sham and SCI MSSA-infected mice at H24 (each group, n = 6). Data are representative of three independent experiments. Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion. (A) **P* = 0.0252 & ****P* = 0.0007 (B) **P* = 0.0159 (C) **P* = 0.035 Mann-Whitney non-parametric test; (A) and (B) ns with Kruskal-Wallis non-parametric test.

Supplemental Figure S7: Immunotherapy protocol and effects of anti-PD-1 antibody on splenic T lymphocytes (T-cells) and NKT cells. (A) Schema of immunotherapy protocol. (B) Percentage of viable splenic CD4⁺ T-cells in Sham and SCI non-infected mice with anti-PD-1 or isotype control antibody 72 hours after surgery (each group, n = 6). (C) Percentage of IFN- γ ⁺ NKT cells and (D) Percentage of IFN- γ ⁺ CD8⁺ NKT cells, in Sham and SCI non-infected mice with anti-PD-1 or isotype control antibody 72 hours after surgery without infection. Data are representative of two independent experiments. Sham, mice with surgical procedure without medullar lesion; SCI, spinal cord injury mice with surgical procedure and medullar lesion. (B) * $P = 0.0245$, (C) * $P = 0.028$, and (D) $P = 0.057$ Mann-Whitney non-parametric test.

Supplemental Figure S8: T lymphocytes, NKT and NK cells gating strategy. Left to the right: to identify splenic lymphocyte populations, we first gated on cells based on forward (FSC) and side scatter (SSC) properties; we excluded doublets and then dead cells. From this gate, CD3⁺NK1.1⁻ T cells, CD3⁺NK1.1⁺ NKT cells and CD3⁻NK1.1⁺ NK cells were selected; and each cell population was divided by using CD4 and CD8 expression.

Thèse de Doctorat

Tiphaine RUGGERI

Validation d'un modèle murin de traumatisme médullaire entraînant une immunodépression, et évaluation d'une immunothérapie par un anticorps anti-PD-1

Validation of Spinal Cord Injury mouse model leading to immunosuppression and evaluation of immunotherapy by an anti-PD-1 antibody

Résumé

Les traumatismes sévères représentent la première cause de mortalité chez les moins de 30 ans et constituent un problème majeur de santé publique. La pneumonie est l'infection majeure à l'origine de décès précoces chez les patients atteints de lésion médullaire. Ces patients présentent une défaillance au niveau de l'interaction entre le système nerveux central et le système immunitaire, induisant une immunosuppression, responsable d'une sensibilité accrue aux infections. Notre travail a consisté à valider un modèle murin de traumatisme médullaire (SCI), en reproduisant le scénario vu en clinique. Nous avons mis en évidence dans notre modèle i) la présence d'une lésion médullaire ; ii) une sensibilité plus accrue à une pneumonie à *S. aureus*; iii) une phase hyper-inflammatoire à un temps précoce après le traumatisme; iv) une phase d'immunosuppression tardive associée à : une lymphopénie, une diminution de production de TNF- α , une diminution de l'expression des molécules du CMH-II sur les cellules dendritiques, une augmentation de la production d'IL-10, et une augmentation de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T. Actuellement, chez les patients traumatisés médullaires, il n'existe encore aucune thérapie visant la stimulation du système immunitaire adaptatif. Seules des études sur des modèles de sepsis ont testé les effets de l'immunothérapie par anticorps anti-PD-1. Nous avons testé cette approche novatrice dans notre modèle de lésion médullaire chez la souris. L'anticorps anti-PD1 augmente la survie des souris neurolésées et infectées par *S. aureus*; le traitement restaure une réponse immunitaire par l'augmentation de la production d'IFN- γ par les cellules NKT.

Mots clés

PD-1, lésion médullaire, immunothérapie, immunosuppression, pneumonie, NKT, *Staphylococcus aureus*

Abstract

Severe trauma is the leading cause of death among young people under 30 years old and is a major public health problem. Bacterial pneumonia is the major cause of death and poor neurological outcome in patients with spinal cord injury. These patients undergo a balance disruption between the central nervous system and the immune system which results in the establishment of an immunosuppression rendering patients prone to secondary infections. Our work aimed at validating a robust spinal cord injury (SCI) mouse model, by reproducing the clinic scenario. We demonstrated in our model i) the presence of spinal cord injury; ii) an increase susceptibility to *S. aureus* pneumonia following trauma; iii) the presence of an hyper-inflammatory phase at an early stage after the trauma; iv) the presence of a late immunosuppression phase associated with: a lymphopenia, a decrease of MHC-II expression on splenic dendritic cells, an increase of IL-10 production, and an increase of PD-1 expression on T lymphocytes (marker of T-cell exhaustion). Currently in patients with severe trauma, were treated with innate system activating drugs, but there is still no therapy aiming at stimulating the adaptative immune system to overcome immunosuppression. We decided to use this novel approach in our SCI mouse model. Anti-PD1 antibody increased the survival rate of SCI mice infected by *S. aureus*; and restored, at least in part the immune response to secondary infection, through an increase of IFN- γ by NKT cells.

Key Words

PD-1, spinal cord injury, immunotherapy, immunosuppression, pneumonia, NKT, *Staphylococcus aureus*