



HAL
open science

Biomarqueurs des états septiques sévères : vers de nouvelles stratégies thérapeutiques individualisées

Caroline Guignant

► **To cite this version:**

Caroline Guignant. Biomarqueurs des états septiques sévères : vers de nouvelles stratégies thérapeutiques individualisées. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10319 . tel-00744932

HAL Id: tel-00744932

<https://theses.hal.science/tel-00744932>

Submitted on 24 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I

N° d'ordre

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I
Pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 12 décembre 2011

par

Mlle Caroline **GUIGNANT**

BIOMARQUEURS DES ETATS SEPTIQUES SEVERES :
VERS DE NOUVELLES STRATEGIES
THERAPEUTIQUES INDIVIDUALISEES

Directeur de thèse : Dr Guillaume MONNERET

JURY : Monsieur le Professeur K. ASEHNOUNE (Rapporteur)
Monsieur le Professeur C. DROUET (Rapporteur)
Monsieur le Professeur B. ALLAOUCHICHE
Monsieur le Professeur F. ZENI
Monsieur le Docteur A. LEPAPE
Monsieur le Docteur G. MONNERET

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. A. Bonmartin

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

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

M. le Professeur D. Simon

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les différents membres de mon jury :

A Messieurs les Professeurs Karim Asehnoune et Christian Drouet pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

A Messieurs les Professeurs Bernard Allaouchiche et Fabrice Zeni pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Docteur Alain Lepape pour votre enthousiasme et l'éclairage clinique que vous apportez à l'équipe et qui contribue à donner du sens à nos recherches.

A Monsieur le Docteur Guillaume Monneret pour votre grande disponibilité, vos compétences, votre rigueur scientifique et votre encadrement de qualité en tant que directeur de thèse. J'ai beaucoup appris en travaillant dans votre équipe et c'est avec plaisir que je m'y impliquerai sur de nouveaux projets.

Je remercie également :

Nicolas Voirin qui m'a initié aux statistiques, a contribué à ce travail, et continue à m'apporter son aide dès que nécessaire.

Les attachées de recherche clinique du Centre Hospitalier de Lyon Sud – Hélène, Sylvie, Marion, Séraphine et Nathalie – pour leur bonne humeur, leur disponibilité et leur aide si précieuse dans le recueil des données cliniques.

Merci à Fanny Davin et Aurélie Chéron-Gouel dont le travail a contribué à celui-ci.

Le personnel du laboratoire d'Immunologie de l'hôpital E Herriot : je suis ravie de travailler parmi vous depuis quatre ans dans une ambiance familiale. Merci à Cathy qui est toujours prête à rendre service et qui le fait si bien ! Merci à Patrick et Claude pour leur humour quotidien ! Merci à Anne pour ta grande disponibilité, ton écoute et ton aide sur le plan technique, scientifique (et culinaire !). Merci à Fabienne pour ton encadrement scientifique, ton implication dans ce travail et ta sympathie. Merci à Yvette, Sandrine, Agnès, Françoise P, Brigitte, Françoise PL, Julien, Christophe, Khadija et Bénédicte. Merci pour vos attentions au quotidien qui m'ont encouragées dans ce long travail ! Merci à mes co-internes dont Astrid, Anthony, Charlotte, Anne-Perrine, Rémi, Fanny, Cécile, Julie et Céline pour votre sympathie et votre soutien pendant toutes ces heures d'écriture !

DEDICACES

Je dédie ce travail à mes amis et ma famille, tout particulièrement :

A Pascal qui m'entoure de son amour chaque jour. Merci d'avoir été si attentionné pendant cette année difficile. A mon tour de te rendre la pareille l'an prochain !

A mes parents Colette et Jean-Marie (grands-parents depuis peu !), mes grands-parents Paulette qui nous manque tant et Jean, à Stéphane, Anne-Sophie, Philippe, le petit Arnaud, Jean-Pierre et Léa. Merci pour vos encouragements et votre soutien. Vous m'avez permis d'avancer jusque là. Merci pour les agréables moments passés ensemble, vivement les prochains !

A Andréa et Daniel : merci pour vos pensées et vos cartes postales du bout du monde ! A Séverine, Nicolas et le petit Lilian : merci pour les moments chaleureux passés ensemble cet été. A Sandra et Vincent : merci de nous régaler par votre créativité et vos talents culinaires !

A mes amis d'enfance les plus chers : Emilie, Virginie et Geoffrey (les jeunes mariés nippons !). Merci pour votre présence ! A Julie si pétillante de vie, c'est une chance que tu sois sur Lyon.

A mes amies de fac : Marie, Sabrina, Stéphanie D, Stéphanie G et aux amis lyonnais et stéphanois que j'ai connus grâce à l'internat : Marie, Mirela, Khanh, Anaïs, Sophie, Vincent et sa petite famille. J'espère pouvoir vous consacrer plus de temps en 2012 !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
PREAMBULE.....	15
1. DEFINITION DES SYNDROMES SEPTIQUES	16
2. EPIDEMIOLOGIE DES SYNDROMES SEPTIQUES.....	17
2.1. INCIDENCE.....	17
2.2. MORTALITE ET MORBIDITE	17
2.3. COUT	19
2.4. FACTEURS DE RISQUE	20
2.4.1. Age.....	20
2.4.2. Sexe.....	21
2.4.3. Origine ethnique.....	22
2.4.4. Polymorphisme génique.....	23
3. ETIOLOGIE.....	24
4. DIAGNOSTIC DU SEPSIS	26
5. PHYSIOPATHOLOGIE DES SYNDROMES SEPTIQUES.....	30
5.1. PHASE PRO-INFLAMMATOIRE.....	30
5.1.1. Mécanismes responsables.....	30
5.1.2. Défaillance d'organe multiviscérale.....	33
5.1.3. Dysfonction du système cardio-vasculaire lors du choc septique.....	35
5.1.3.1. Physiopathologie de la défaillance cardio-vasculaire lors du choc septique.....	35
5.1.3.1.1. Atteinte du système endothélial	35
5.1.3.1.2. Atteinte du myocarde	38
5.1.3.2. Intérêt des biomarqueurs	41
5.1.3.2.1. Physiopathologie et pharmacologie des hormones vasoactives.....	41
5.1.3.2.1.1. Endothéline-1.....	41
5.1.3.2.1.2. Vasopressine.....	42
5.1.3.2.1.3. Adrénomédulline	44
5.1.3.2.1.4. Peptide natriurétique auriculaire.....	45
5.1.3.2.2. Intérêt analytique des pro-hormones.....	47
5.2. PHASE ANTI-INFLAMMATOIRE.....	49
5.2.1. Mécanismes responsables.....	49
5.2.1.1. Régulation centrale.....	49
5.2.1.2. Production de médiateurs anti-inflammatoires.....	51
5.2.1.3. Tolérance à l'endotoxine	52
5.2.1.4. Epigénétique.....	55
5.2.1.5. Apoptose	57
5.2.2. Dysfonction du système immunitaire lors du choc septique.....	59
5.2.2.1. Dysfonction monocyttaire	59
5.2.2.1.1. Production cytokinique	60
5.2.2.1.2. Recrutement cellulaire et réponse défensive contre le pathogène	60
5.2.2.1.3. Présentation antigénique et expression de HLA-DR monocyttaire	61
5.2.2.2. Dysfonction lymphocytaire	64
5.2.2.2.1. Apoptose et lymphopénie.....	64
5.2.2.2.2. Diminution des fonctions prolifératives lymphocytaires.....	65
5.2.2.2.3. Lymphocytes T régulateurs.....	65
5.2.2.2.4. Modulation de l'expression des molécules co-stimulatrices	67
5.2.2.2.4.1. Diminution de l'expression des molécules co-activatrices.....	68
5.2.2.2.4.2. Augmentation de l'expression des molécules co-inhibitrices	68
5.2.2.3. Le système PD-1	69
5.2.2.3.1. Expression et structure protéiques.....	69

5.2.2.3.2.	Expression cellulaire des molécules du système PD-1	70
5.2.2.3.3.	Signalisation des molécules PD-1 et PD-L.....	71
5.2.2.3.4.	Rôle physiopathologique des molécules du système PD-1.....	73
5.2.2.3.4.1.	Tolérance et auto-immunité	73
5.2.2.3.4.2.	Pathologies infectieuses	74
5.2.2.3.4.3.	Pathologies cancéreuses.....	76
6.	PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE	79
6.1.	LES THERAPEUTIQUES PRIORITAIRES DU SEPSIS SEVERE	79
6.1.1.	Traitement de l'infection	79
6.1.2.	Traitement hémodynamique	80
6.2.	TRAITEMENTS COMPLEMENTAIRES DE SUPPLEANCE	82
6.2.1.	Ventilation assistée.....	82
6.2.2.	Contrôle glycémique	82
6.2.3.	Traitement de suppléance de la dysfonction rénale	83
6.3.	NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES.....	85
6.3.1.	Protéine C activée.....	85
6.3.2.	Corticoïdes à faible dose.....	86
6.4.	CORRECTION DES DESORDRES IMMUNO-INFLAMMATOIRES	87
6.4.1.	Thérapies immunostimulantes étudiées en clinique	87
6.4.1.1.	IFN- γ	87
6.4.1.2.	GM-CSF.....	89
6.4.1.3.	G-CSF	91
6.4.2.	Perspectives thérapeutiques	93
6.4.2.1.	Thérapeutiques anti-apoptotiques.....	93
6.4.2.2.	anti-IL10.....	95
6.4.2.3.	Autres approches expérimentales	96
6.4.2.3.1.	Anti-T régulateur.....	96
6.4.2.3.2.	Anti-co-récepteur inhibiteur.....	96
6.4.2.3.3.	Fms-like tyrosine kinase 3 ligand.....	98
6.4.2.3.4.	Interleukine-7.....	98
7.	VERS UNE INDIVIDUALISATION CIBLEE DE LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS.....	100
7.1.	LES LEÇONS DE L'ECHEC THERAPEUTIQUE DES ANTI-INFLAMMATOIRES DANS LE TRAITEMENT DU CHOC SEPTIQUE.....	100
7.2.	LIMITES DES MODELES ANIMAUX DANS L'ETUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE SEPTIQUE	104
7.3.	HETEROGENEITE DES PATIENTS SEPTIQUES.....	107
8.	SYNTHESE ET PRESENTATION DU TRAVAIL PERSONNEL.....	110
	TRAVAUX DE RECHERCHE	111
1.	ASSESSMENT OF PRO-VASOPRESSIN AND PRO-ADRENOMEDULLIN AS PREDICTORS OF 28-DAY MORTALITY IN SEPTIC SHOCK PATIENTS	113
2.	PROATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE IS A BETTER PREDICTOR OF 28-DAY MORTALITY IN SEPTIC SHOCK PATIENTS THAN PROENDOTHELIN-1.....	113
3.	PERSISTENT HIGH LEVEL OF CIRCULATING MR-PROADM AND INCREASED RISK OF NOSOCOMIAL INFECTIONS AFTER SEPTIC SHOCK	131
4.	PROGRAMMED DEATH-1 LEVELS CORRELATE WITH INCREASED MORTALITY, NOSOCOMIAL INFECTION AND IMMUNE DYSFUNCTIONS IN SEPTIC SHOCK PATIENTS	144
5.	LACK OF RECOVERY IN MONOCYTE HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN-DR EXPRESSION IS INDEPENDENTLY ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF SEPSIS AFTER MAJOR TRAUMA.....	156
6.	EARLY ASSESSMENT OF LEUKOCYTE ALTERATIONS AT DIAGNOSIS OF SEPTIC SHOCK	167
7.	UPREGULATION OF THE PRO-APOPTOTIC GENES BID AND FAS IN SEPTIC SHOCK PATIENTS.....	174
8.	ASSESSMENT OF PLASMATIC IMMUNOGLOBULIN G, A AND M LEVELS IN SEPTIC SHOCK PATIENTS.....	185

DISCUSSION	191
1. SYNTHÈSE DES RESULTATS	192
1.1. PRO-HORMONES CARDIO-VASCULAIRES	192
1.2. IMMUNODEPRESSION ACQUISE EN REANIMATION	195
1.2.1. <i>Altérations des monocytes et des cellules dendritiques</i>	195
1.2.2. <i>Altérations lymphocytaires</i>	197
2. INTERET DES BIOMARQUEURS POUR UNE THERAPEUTIQUE CIBLEE ET INDIVIDUALISEE	202
2.1. DEFINITIONS ET GENERALITES SUR LES BIOMARQUEURS	202
2.2. INTERETS DES BIOMARQUEURS DANS LA PRISE EN CHARGE DU SEPSIS	205
2.2.1. <i>Diagnostic de l'état septique</i>	205
2.2.2. <i>Contrôle de l'efficacité de l'antibiothérapie</i>	208
2.2.3. <i>Stratification des patients par groupe de sévérité et défaillance d'organe</i>	209
2.2.4. <i>Concept de théragnostic</i>	212
2.2.5. <i>Prédiction du risque d'infection secondaire</i>	215
2.2.6. <i>Panel de biomarqueurs</i>	217
2.2.6.1. Association de plusieurs biomarqueurs	217
2.2.6.2. Notion de temps	219
2.2.6.3. Association aux données cliniques	220
2.3. LIMITES ACTUELLES	2244
CONCLUSION	225
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 227
 ANNEXES	 253
<i>Innovative therapeutic strategies for restoring lymphocyte functions in septic patients</i>	253
<i>Flow Cytometry Developments and Perspectives in Clinical Studies: Examples in ICU Patients</i>	259

LISTE DES ABREVIATIONS

ADM	adrénomédulline
ADN	acide désoxyribonucléique
ANP	peptide natriurétique auriculaire
APACHE	<i>acute physiology and chronic health evaluation</i>
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
AUC	<i>area under curve</i>
AVP	vasopressine
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>
CD	cluster de différenciation
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
CIITA	<i>(MHC) class II transactivator</i>
CLP	ligature et ponction caecales
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CNP	<i>C-natriuretic peptide</i>
CPA	cellule présentatrice de l'antigène
CRLR	<i>calcitonin receptor-like receptor</i>
CRP	protéine C réactive
CT	<i>C-terminal</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
CX3CR1	<i>chemokine (C-X3-C motif) receptor 1</i>
ET-1	endothéline-1
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
Fas-L	<i>Fas-ligand</i>
Flt3L	<i>Fms-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating-factor</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen-DR</i>

HLA-DRm	HLA-DR monocytaire
HR	<i>hazard ratio</i>
IC95%	intervalle de confiance à 95 %
IFN-γ	interféron-gamma
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IL-1ra	<i>IL-1 receptor antagonist</i>
IRA	insuffisance rénale aiguë
IRAK	<i>IL-1 receptor associated kinase</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
ITSM	<i>immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
J	jour
KO	<i>knock-out</i>
LAG-3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LBA	lavage broncho-alvéolaire
LPS	lipopolysaccharide
mDC	cellule dendritique myéloïde
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MR	<i>mid-regional</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NO	monoxyde d'azote
NOSc	NO-synthase constitutive
NOSi	NO-synthase inductible
NPR-A	<i>natriuretic peptide receptor A</i>
NPR-C	<i>natriuretic peptide clearance receptor</i>
OR	odds ratio
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCT	procalcitonine
PD-1	<i>programmed death-1</i>
PD-L	<i>programmed-death ligand</i>
PGE2	prostaglandine E2
PHA	phytohémagglutinine
PI3K	phosphatidyl inositol 3-kinase
PIRO	prédisposition, infection, réponse de l'hôte, dysfonction d'organe

PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
PNN	polynucléaire neutrophile
RAMP	<i>receptor-activity modifying protein</i>
rhAPC	protéine C activée humaine recombinante
rhIL-7	IL-7 recombinante humaine
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
ROC	<i>receiver operating curve</i>
RR	risque relatif
SAPS II	<i>simplified acute physiology score II</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> méticilline-résistant
SHP-1	<i>Src homology region 2-domain containing tyrosine phosphatase 1</i>
SIRS	syndrome de réponse inflammatoire systémique
SNA	système nerveux autonome
SNC	système nerveux central
SNP	polymorphisme nucléotidique simple
SOFA	<i>sequential organ failure assessment</i>
sTREM-1	TREM-1 soluble
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF-β	<i>tumor growth factor-beta</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNM	<i>Tumor, Nodes, Metastasis</i>
Treg	lymphocyte T régulateur
TREM-1	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i>
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : TAUX DE MORTALITE DES ETATS SEPTIQUES EN FONCTION DU STADE DE SEVERITE AUX ETATS-UNIS	18
FIGURE 2 POURCENTAGE DE SURVIE DES PATIENTS JUSQU'A 5 ANS APRES L'EPISODE DE SEPSIS SEVERE PAR GROUPE D'AGE	19
FIGURE 3 : NOMBRE ET POURCENTAGE D'ADMISSION EN REANIMATION DE PATIENTS EN SEPSIS SEVERE EN FONCTION DE LEUR AGE ET DE LEUR SEXE AU ROYAUME-UNI ENTRE 1995 ET 2000	20
FIGURE 4 : INCIDENCE DU SEPSIS ENTRE 1979 ET 2000 AUX ETATS-UNIS EN FONCTION DU SEXE DES PATIENTS	21
FIGURE 5 : INCIDENCE DU SEPSIS ENTRE 1979 ET 2001 AUX ETATS-UNIS EN FONCTION DU GROUPE ETHNIQUE DES PATIENTS	22
FIGURE 6 : NOMBRE DE CAS DE SEPSIS AUX ETATS-UNIS EN FONCTION DES MICROORGANISMES RESPONSABLES ENTRE 1979 ET 2001	24
FIGURE 7 : PROPORTION DE SARM PARMIS LES BACTERIEMIES A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> DANS LES PAYS EUROPEENS EN 2002	25
FIGURE 8 : EXEMPLES DE MOLECULES EXOGENES ET ENDOGENES RECONNUES PAR LES TLR	30
FIGURE 9 : MECANISMES D'AMPLIFICATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE A L'INFECTION	32
FIGURE 10 : LES MULTIPLES DYSFONCTIONS D'ORGANES POUVANT SE METTRE EN PLACE LORS DU CHOC SEPTIQUE	34
FIGURE 11 : POURCENTAGE DE MORTALITE DES PATIENTS SEPTIQUES EN FONCTION DU NOMBRE D'ORGANES DEFAILLANTS	34
FIGURE 12 : MECANISMES PARTICIPANT A L'ALTERATION DE LA PERFUSION MICROVASCULAIRE AU COURS DU SEPSIS	36
FIGURE 13 : DIFFERENTS MECANISMES PARTICIPANT AUX DYSFONCTIONS VASCULAIRES LORS DES ETATS SEPTIQUES	37
FIGURE 14 : MODIFICATIONS DES PERFORMANCES MYOCARDIQUES A LA PHASE AIGUE ET A LA PHASE TARDIVE DU CHOC SEPTIQUE	38
FIGURE 15 : MECANISMES IMPLIQUES DANS LES DYSFONCTIONS MYOCARDIQUES LORS DES ETATS SEPTIQUES	40
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES RECEPTEURS A L'ET-1 AU NIVEAU VASCULAIRE	42
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE INDUITE PAR LA FIXATION DE L'AVP AUX RECEPTEURS V1 ET V2	43
FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SIGNAUX INTRACELLULAIRES INDUITS PAR LA FIXATION DE L'ADM AUX RECEPTEURS DU CGRP ET CONDUISANT A UNE RELAXATION VASCULAIRE	45
FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES INTRACELLULAIRES INDUITS PAR LA FIXATION DE L'ANP AUX RECEPTEURS NPR-A ET NPR-C	46
FIGURE 20 : QUATRE PRECURSEURS D'HORMONES VASOACTIVES : MR-PROANP, MR-PROADM, CT-PROAVP, CT-PROET-1	48
FIGURE 21 : CONNEXION SCHEMATIQUE ENTRE LE SYSTEME NERVEUX ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE	50
FIGURE 22 : EXEMPLES DE MEDIEURS IMPLIQUES DANS L'ALTERATION DE L'ACTIVATION DU NF-KB	54
FIGURE 23 : LA VOIE EXTRINSEQUE ET LA VOIE INTRINSEQUE DE L'APOPTOSE	57

FIGURE 24 : EFFET DE L' APOPTOSE SUR LES DIFFERENTES POPULATIONS LEUCOCYTAIRES	59
FIGURE 25 : PRINCIPAUX MECANISMES SUPPRESSEURS DES TREG	66
FIGURE 26 : MODELE DES DEUX SIGNAUX NECESSAIRES A L' ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE	67
FIGURE 27 : PLUSIEURS SYSTEMES DE CO-STIMULATION DE LA FAMILLE B7:CD28.....	69
FIGURE 28 : EXPRESSION CELLULAIRE DES MOLECULES DU SYSTEME PD-1 EN FONCTION DE LEUR ETAT D'ACTIVATION.....	71
FIGURE 29 : SIGNALISATION INDUITE PAR LA FIXATION DE PD-1 A SES LIGANDS PD-L.....	72
FIGURE 30 : EVOLUTION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE AU COURS DU TEMPS LORS DES ETATS SEPTIQUES ET RISQUE DE REACTIVATION VIRALE.....	78
FIGURE 31 : RELATION ENTRE LE DELAI DE MISE EN PLACE DE L' ANTIBIOTHERAPIE ET LE RISQUE DE MORTALITE DES PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE.....	80
FIGURE 32 : PRISE EN CHARGE HEMODYNAMIQUE INITIALE DU SEPSIS SEVERE.....	81
FIGURE 33 : MODE D' ACTION SUPPOSE DE LA PROTEINE C ACTIVEE	85
FIGURE 34 : AMELIORATION DE L' EXPRESSION DE HLA-DRM ET DE LA REPOSE FONCTIONNELLE DES MONOCYTES APRES ADMINISTRATION D' IFN- γ A DES PATIENTS SEPTIQUES IMMUNODEPRIMES	88
FIGURE 35 : EFFETS DU GM-CSF SUR DIFFERENTES POPULATIONS LEUCOCYTAIRES	89
FIGURE 36 : EXPRESSION DE HLA-DRM ET PRODUCTION MONOCYTAIRE DE TNF-A CHEZ DES PATIENTS SEPTIQUES IMMUNODEPRIMES RECEVANT DU GM-CSF	90
FIGURE 37 : AMELIORATION DE LA SURVIE DES SOURIS SEPTIQUES APRES ADMINISTRATION D' ANTICORPS BLOQUANT PD-1	97
FIGURE 38 : RESTAURATION D' UNE REPOSE D' HYPERSENSIBILITE RETARDEE AU TRINITROPHENYL CHEZ LES SOURIS SEPTIQUES APRES ADMINISTRATION D' IL-7 RECOMBINANTE HUMAINE.....	99
FIGURE 39 : EXEMPLE D' UN POTENTIEL SCORE PIRO	109
FIGURE 40 : APPLICATIONS CLINIQUES DES BIOMARQUEURS	203
FIGURE 41 : CONDITIONS REQUISES POUR L' UTILISATION EN CLINIQUE D' UN BIOMARQUEUR	204
FIGURE 42 : EXEMPLES DE REPRESENTATIONS GRAPHIQUES COULEUR EN MOSAÏQUE DE PROFILS GENIQUES PERMETTANT DE STRATIFIER LES PATIENTS EN 3 GROUPES DE SEVERITE	212
FIGURE 43 : EXEMPLES DE MOLECULES POTENTIELLEMENT INTERESSANTES POUR REVERSER L' IMMUNOSUPPRESSION INDUITE PAR LES ETATS SEPTIQUES ET PRESENTANT UN INTERET THERAGNOSTIQUE	214
FIGURE 44 : STRATEGIE POTENTIELLE POUR DIAGNOSTIQUER DIFFERENTS TYPES DE CAUSES INFECTIEUSES DU SEPSIS A PARTIR D' UNE ASSOCIATION DE BIOMARQUEURS.....	218
FIGURE 45 : EXEMPLE D' UN NOMOGRAMME PERMETTANT D' EVALUER LE RISQUE DE MORTALITE DES PATIENTS EN COMBINANT LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN MR-PROANP AVEC LE SCORE DE SEVERITE SAPS II	221

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : DEFINITION DES SYNDROMES SEPTIQUES SELON LA REUNION D'EXPERTS DE L'ACCP/SCCM	16
TABLEAU 2 : EXEMPLES DE PATHOLOGIES NON INFECTIEUSES POUVANT ETRE ASSOCIEES A UN SIRS	26
TABLEAU 3 : EXEMPLES DE MOLECULES POUVANT RETABLIR LA FONCTIONNALITE DES CELLULES IMMUNITAIRES AU COURS DU SEPSIS DANS LES MODELES EXPERIMENTAUX	93
TABLEAU 4 : APPROCHES THERAPEUTIQUES PERMETTANT DE PREVENIR L'APOPTOSE LYMPHOCYTAIRE AU COURS DU SEPSIS DANS LES MODELES MURINS.....	93
TABLEAU 5 : EFFET DE PLUSIEURS TRAITEMENTS ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIENS SUR LA MORTALITE DES PATIENTS SEPTIQUES.....	102
TABLEAU 6 : DOSE LETALE DU LPS CHEZ L'HOMME ET DANS DIFFERENTES ESPECES ANIMALES	105
TABLEAU 7 : DISCORDANCE ENTRE L'HETEROGENEITE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE SEPTIQUE EN CLINIQUE ET LES MODELES ANIMAUX STANDARDS.....	106
TABLEAU 8 : FREQUENCE D'UTILISATION DES TRAITEMENTS DE SUPPLEANCE DANS LES MODELES ANIMAUX VERSUS LA PRISE EN CHARGE CLINIQUE.....	106
TABLEAU 9 : PROPOSITION DE DONNEES A REPORTER DANS LES ETUDES PRE- CLINIQUES POUR FACILITER LEUR COMPARAISON.....	107
TABLEAU 10 : EXEMPLES DE PARAMETRES POUVANT ETRE INCLUS DANS LE CONCEPT DU SCORE PIRO	109
TABLEAU 11 : EXEMPLE D'UN SCORE DE RISQUE DE MORTALITE ASSOCIANT DES PARAMETRES CLINIQUES ET DES BIOMARQUEURS	222
TABLEAU 12 : EXEMPLE D'ALGORITHMES DE DECISION POUR GUIDER LA THERAPEUTIQUE ANTIBIOTIQUE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS D'INFECTION NON PULMONAIRE PEU SEVERE, D'INFECTION PULMONAIRE MODEREMENT SEVERE OU TRES SEVERE	223

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PREAMBULE

En dépit de nombreux essais cliniques et d'une prise en charge adéquate des patients dans les premières heures du choc septique (antibiothérapie, remplissage vasculaire agressif), la mortalité liée aux syndromes septiques reste très élevée. C'est la première cause de mortalité dans les services de soins intensifs. La grande hétérogénéité des patients septiques pourrait en partie expliquer cette situation. Ainsi à l'avenir, il sera probablement souhaitable de personnaliser les traitements en se basant sur une meilleure caractérisation des patients. C'est ce qui a constitué l'axe directeur de notre travail.

Dans une première partie de revue de la littérature, nous avons essayé d'envisager les principales caractéristiques liées aux états septiques sévères. Néanmoins, étant donné les multiples aspects de la physiopathologie, il était difficile d'appréhender l'ensemble des défaillances d'organes de manière exhaustive. De plus, compte tenu de la nature des travaux personnels présentés dans la deuxième partie de ce document, nous avons choisi de détailler particulièrement la défaillance cardio-vasculaire, très précoce dans la physiopathologie du choc septique, et celle plus tardive du système immunitaire.

1. Définition des syndromes septiques

Les syndromes septiques ne constituent pas une pathologie à part entière mais une somme de symptômes cliniques non spécifiques. En 1991, lors de la conférence de consensus de l'« *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference* » (ACCP/SCCM), Bone *et al.* ont fourni les éléments d'une classification des syndromes septiques (1). Quatre stades ont été décrits : le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique par ordre de sévérité (**Tableau 1**). Brièvement, le SIRS décrit tout processus inflammatoire systémique indépendamment de sa cause ; le sepsis correspond au SIRS associé à un processus infectieux ; le sepsis sévère au sepsis auquel s'ajoute une dysfonction d'organe, une hypoperfusion ou une hypotension ; et enfin le choc septique à un état d'hypotension induit par le sepsis, persistant malgré un remplissage vasculaire adéquat.

	Critères de définition
Infection	Invasion par des microorganismes d'un tissu normalement stérile
Réponse systémique inflammatoire (SIRS)	Au moins 2 des critères suivants : <ul style="list-style-type: none"> - température > 38°C ou < 36°C - fréquence cardiaque > 90 batt/min - fréquence respiratoire > 20/min ou PaCO₂ < 32mmHg - leucocytes > 12000/mm³ ou < 4000/mm³
Sepsis	SIRS associé à une infection
Sepsis sévère	Sepsis associé à : <ul style="list-style-type: none"> - une hypotension (PA systolique < 90 mmHg, ou chute de plus de 40 mmHg par rapport à la PA systolique habituelle) ou <ul style="list-style-type: none"> - une hypoperfusion d'organe telle que : <ul style="list-style-type: none"> ▪ PaO₂/FiO₂ < 280 ▪ acidose lactique ▪ oligurie (< 0,5 ml/kg/h) ▪ altération des fonctions supérieures
Choc septique	Sepsis sévère associé à une hypotension persistante (> 1 heure) malgré un remplissage vasculaire adéquat ou nécessitant l'administration de médicaments vasoactifs

Tableau 1 : Définition des syndromes septiques selon la réunion d'experts de l'ACCP/SCCM (1)

FiO₂ : fraction d'oxygène dans l'air expiré ; PA : pression artérielle ; PaCO₂ : pression partielle artérielle en CO₂

De telles définitions ont constitué une première étape dans la volonté de mieux caractériser les patients septiques, le but étant d'une part d'améliorer la pratique clinique courante en améliorant le diagnostic, et d'autre part de standardiser le recrutement de ces patients dans les études cliniques afin de faciliter l'interprétation et la comparaison des résultats obtenus (1).

Cependant, les définitions proposées se sont avérées insatisfaisantes (trop généralistes, reflétant mal la complexité de la physiopathologie septique) pour être appliquées à une population de patients septiques très hétérogène (2, 3). En 2001, lors d'une nouvelle conférence, les définitions précédemment citées ont été complétées par l'ajout d'autres critères diagnostiques, par analogie avec le système *Tumor, Nodes, Metastasis* (TNM) utilisé en cancérologie. Le concept d'un score prenant en compte à la fois les caractéristiques de l'hôte et de l'agent infectieux a été proposé sous le terme de score PIRO (Prédisposition – Infection – Réponse de l'hôte – Dysfonction d'organe) (4). Ce score sera détaillé dans la suite du manuscrit.

2. Epidémiologie des syndromes septiques

2.1. Incidence

L'incidence du sepsis est très importante et en constante augmentation depuis de nombreuses années. En 1979, aux Etats-Unis, un taux d'incidence de 82,7 cas de sepsis pour 100 000 habitants était recensé, contre 240,4 cas pour 100 000 habitants en 2000 (5). Cela représente près de 751 000 cas par an de sepsis sévère (6), dont le taux d'incidence a lui aussi augmenté de 64,7 cas en 1993 à 134,6 cas pour 100 000 habitants en 2003 (7). Une augmentation de 1,5 % des cas incidents par an est prévue pour les années à venir, ainsi le seuil du million de cas annuels devrait être franchi aux Etats-Unis avant l'année 2020 (6). En France, le taux d'incidence du sepsis sévère a été évalué à près de 95 cas pour 100 000 habitants (8). Le choc septique représente environ 10 % des admissions en service de réanimation (9, 10).

2.2. Mortalité et morbidité

La mortalité induite par les syndromes septiques est très élevée, constante depuis de nombreuses années, et elle augmente avec les stades de sévérité du sepsis (**Figure 1**) (11). En fonction des cohortes étudiées, la mortalité hospitalière (à 28 jours) est de l'ordre de 20 à 30 % en cas de sepsis (5, 12-14), de 30 à 40% en cas de sepsis sévère (6, 8, 12, 14-16) et jusqu'à 60 % en cas de choc septique (9, 14).

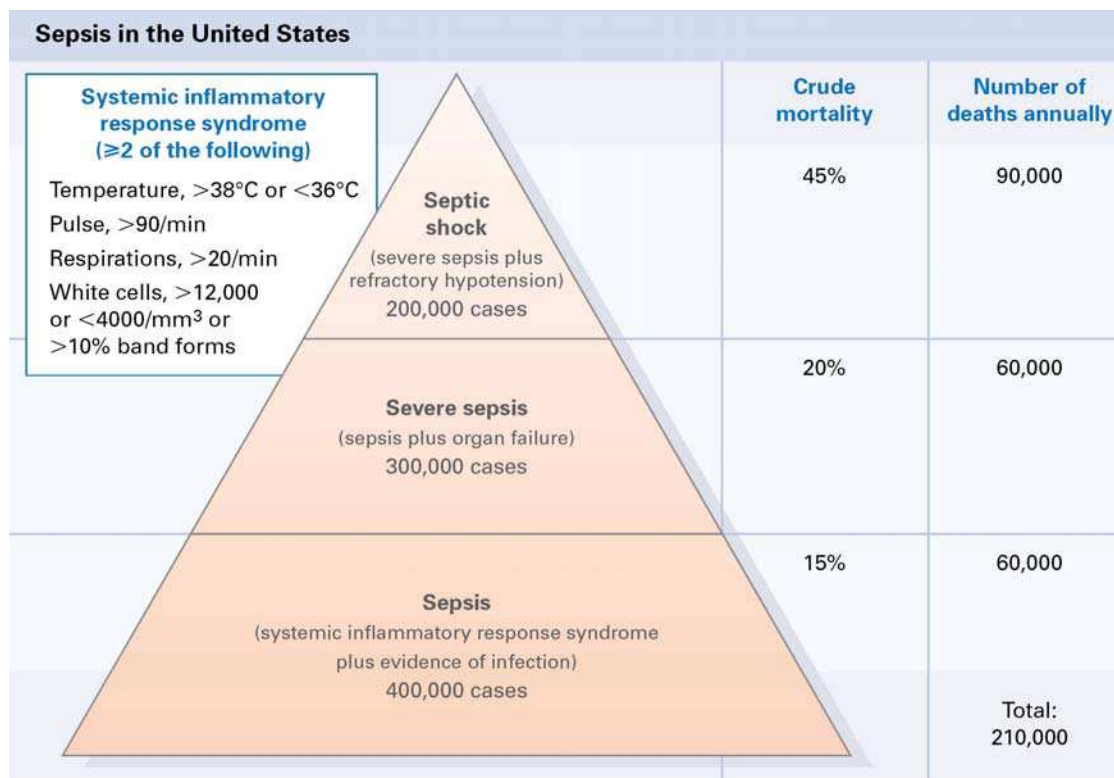
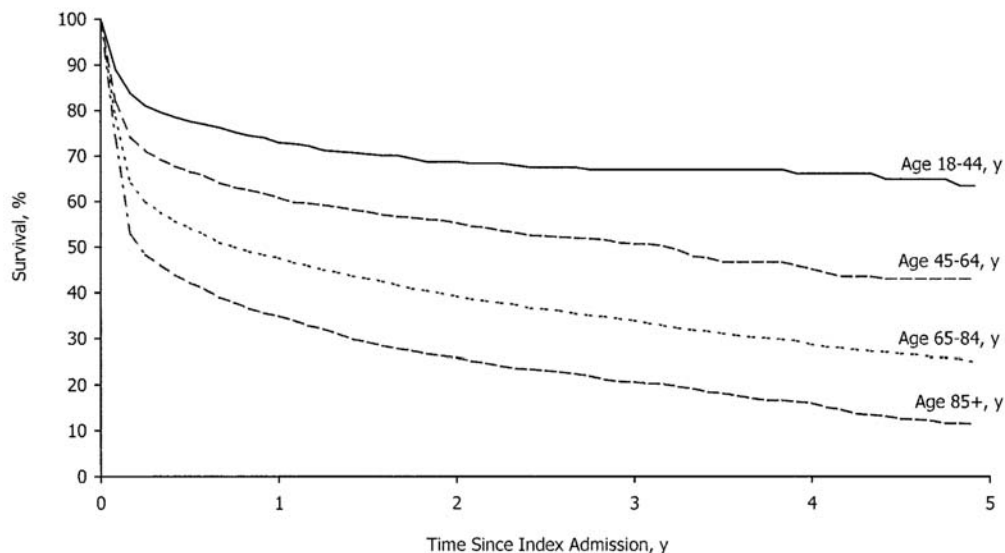


Figure 1 : Taux de mortalité des états septiques en fonction du stade de sévérité aux Etats-Unis (11)

Aux Etats-Unis en 2006, le sepsis constituait la dixième cause de mortalité, toute cause confondue (17). Le taux de létalité (qui correspond au ratio des patients septiques qui décèdent par rapport à la population totale des patients septiques) tendrait à diminuer : ce taux est passé de 45,8 % à 37,8 % aux Etats-Unis entre 1993 et 2003 pour les sepsis sévères (7). Cette baisse pourrait refléter les progrès récents de la prise en charge des patients (18). Cependant, l'incidence étant en constante augmentation, globalement le nombre total de patients qui décèdent suite à un syndrome septique reste réellement important (7).

Peu d'études ont évalué la mortalité à plus long terme : dans une cohorte de 16 019 patients ayant développé un sepsis sévère, la mortalité à un an s'élevait à 51,4 % et à 5 ans à 74,2 % (avec une majorité de patients âgés de plus de 65 ans, **Figure 2**) (19). Cette mortalité « tardive » est très élevée. Il reste cependant difficile d'évaluer le réel impact de l'épisode septique sur le risque accru de mortalité, par rapport à l'effet des co-morbidités qui sont souvent déjà présentes chez les patients (avant l'épisode septique) (20).



No. at risk:						
Age 18-44, y	848	333	186	125	71	40
Age 45-64, y	2,167	758	409	216	121	58
Age 65-84, y	9,802	2,851	1,563	893	519	283
Age 85+, y	3,202	659	329	186	108	53

Figure 2 Pourcentage de survie des patients jusqu'à 5 ans après l'épisode de sepsis sévère par groupe d'âge (19)

Un autre élément pour évaluer l'effet à plus long terme est la morbidité induite par les syndromes septiques, paramètre qui est lui aussi difficile à mesurer. Tout d'abord, une étude menée entre 1993 et 2003 a révélé que la sévérité des épisodes septiques a augmenté au cours du temps : la proportion des patients ayant une seule dysfonction d'organe a diminué (72,4 % en 1993 contre 58,2 % en 2003) alors que celle des patients ayant 2, 3 et au moins 4 dysfonctions d'organes a été multipliée respectivement par 1,3 ; 1,9 et 2,7 (7). Après l'épisode septique, la qualité de vie des patients mesurée à différents niveaux (émotionnel, cognitif, physique, social etc.) semble se dégrader (20, 21). Cependant, les outils pour permettre une telle évaluation ne sont pas actuellement bien définis et nécessiteraient d'être standardisés (22, 23). Au final, les syndromes septiques sévères ne seraient donc pas seulement des pathologies aiguës, mais pourraient avoir des conséquences à plus long terme.

2.3. Coût

Les patients septiques graves nécessitent une surveillance et une prise en charge continue des équipes infirmières et médicales des services de soins intensifs. Cette mobilisation du personnel soignant et le traitement des patients représentent un coût important. D'après une étude américaine menée en 2008 (données de l' «*Agency for healthcare research and quality*»), les syndromes septiques constituent l'une des cinq causes d'hospitalisation les plus coûteuses aux Etats-Unis (24). A titre d'exemple, dans une autre étude américaine, le coût

moyen par patient en sepsis sévère était de 22 100 \$ (6). En France, les résultats sont similaires : le coût moyen de l'hospitalisation des patients en sepsis sévère varie de 23 000 à 35 000 euros par patient, soit un coût plus de deux fois supérieur aux autres patients de réanimation (25, 26). Les syndromes septiques sont donc une cible prioritaire en termes de santé publique.

2.4. Facteurs de risque

Différents facteurs semblent favoriser la survenue du sepsis ou de ses formes plus sévères : des facteurs exogènes au patient tels que l'emploi croissant de thérapies immunosuppressives, de chimiothérapies, de procédés invasifs (cathéter intravasculaire) lors de la prise en charge des patients, l'augmentation des infections causées par des microorganismes résistants aux antibiotiques (27), et des facteurs propres aux patients comme l'âge, le sexe, l'origine ethnique ou certaines prédispositions génétiques que nous présenterons dans cette partie.

2.4.1. Age

L'âge médian des patients septiques est proche de 65 ans dans de nombreuses études (Figure 3) (8, 12, 14, 16, 26, 28-30).

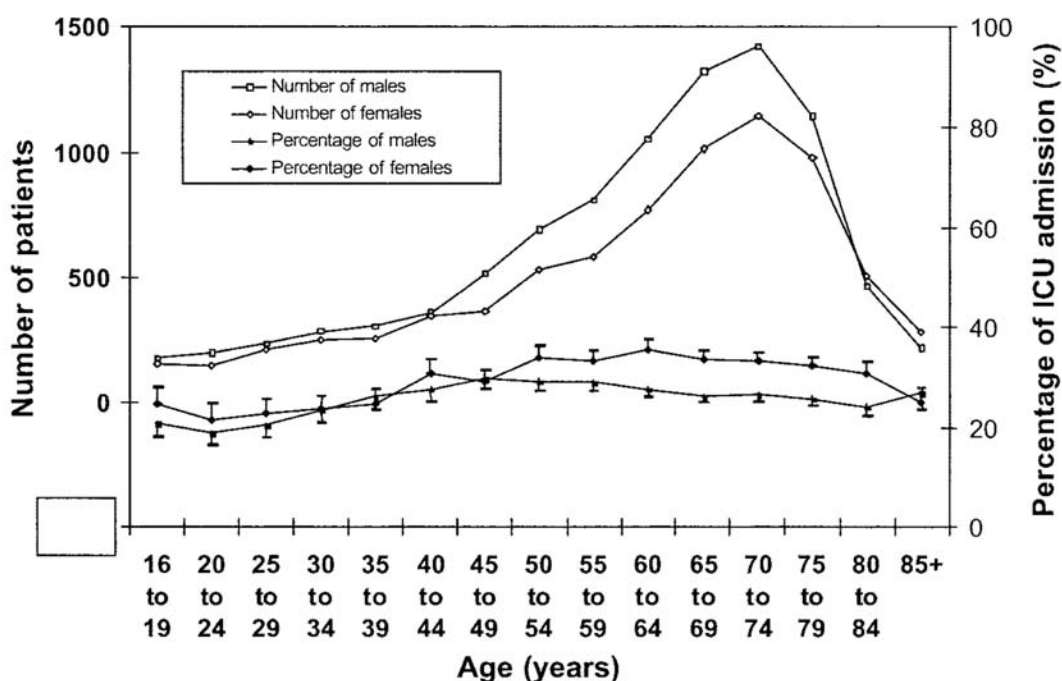


Figure 3 : Nombre et pourcentage d'admission en réanimation de patients en sepsis sévère en fonction de leur âge et de leur sexe au Royaume-Uni entre 1995 et 2000 (16)

De plus, l'âge avancé apparaît comme un facteur favorisant la survenue du sepsis. En effet, dans une étude regroupant 10 millions de cas de sepsis aux Etats-Unis, 65 % des patients

avaient plus de 65 ans, avec un risque de survenue 13 fois plus important chez ces patients par rapport à ceux âgés de moins de 65 ans (Intervalle de confiance à 95 % [IC95%] : 12,6-13,6 (31)). Dans cette étude, après ajustement sur différents facteurs confondants tels que le sexe, l'origine ethnique ou la source d'infection, un âge supérieur à 65 ans restait indépendamment associé à un risque accru de mortalité (Odds Ratio [OR] : 2,26 ; IC95% : 2,17-2,36 ; $p < 0.001$ (31)).

2.4.2. Sexe

Tout d'abord, il a été observé une proportion d'hommes plus importante que de femmes dans plusieurs cohortes de patients septiques (**Figure 4**) (7-9, 12, 15, 19, 28). Martin *et al.* ont montré que les hommes présentaient un risque de sepsis augmenté de 30 % par rapport aux femmes (risque relatif [RR] annuel moyen à 1,28 ; IC95%: 1,24-1,32) (5).

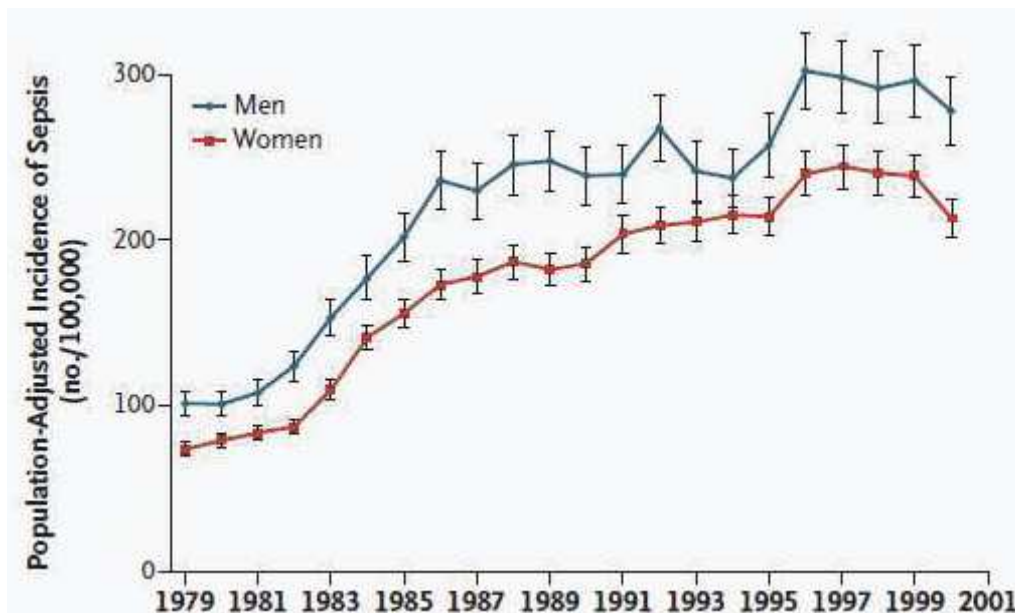


Figure 4 : Incidence du sepsis entre 1979 et 2000 aux Etats-Unis en fonction du sexe des patients (5)

En fonction des études, cette différence liée au sexe est parfois retrouvée au niveau de la mortalité. Après ajustement sur des facteurs cliniques confondants, Adrie *et al.* ont montré que les femmes présentaient un risque de mortalité à l'hôpital réduit par rapport aux hommes (OR = 0,75 ; IC95% 0,57-0,97 ; $p = 0,02$) (28). Ce bénéfice était essentiellement observé chez les patients de plus de 50 ans. De même, Angus *et al.* ont mesuré un risque de mortalité plus important chez les hommes que chez les femmes (29,3 % contre 27,9 % chez les femmes, $p < 0,0001$) (6). Au contraire, d'autres études ont montré un risque de mortalité plus important chez les femmes, ou une absence de différence entre les sexes (5, 8, 12, 32). L'explication

physiopathologique de ces différences potentielles liées au sexe n'est actuellement pas clairement connue. Les hormones sexuelles pourraient agir sur les cellules immunitaires ayant des récepteurs pour ces hormones ; des différences ont été mesurées entre hommes et femmes au niveau de la balance pro- ou anti-inflammatoire en réponse à une stimulation avec du lipopolysaccharide (LPS), mais les résultats sont divergents (33-35).

2.4.3. Origine ethnique

Des différences sont observées concernant l'incidence et/ou la mortalité due au sepsis selon les origines ethniques des patients. Le risque de présenter un sepsis serait plus important dans la population noire ou non blanche par rapport à la population blanche (**Figure 5**) (5). Dans une étude menée sur 25 000 patients septiques, quelque soit la tranche d'âge considérée, le risque de présenter un sepsis était jusqu'à 4 fois plus important chez les patients noirs âgés de 35-44 ans par rapport à celui de patients blancs du même âge (RR = 4,35 ; IC95% 3,93-4,82) (36). En termes de mortalité entre 1979 et 2003, le risque moyen était 2 fois plus important pour la population noire par rapport à la population blanche (RR = 1,9 ; IC95% 1,82-1,98) (32).

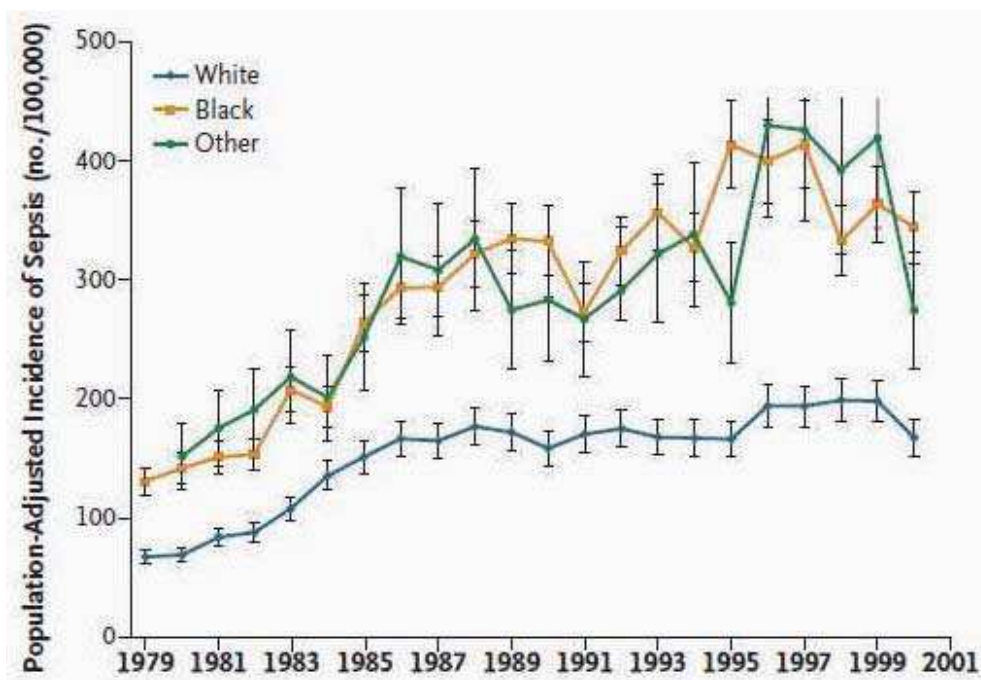


Figure 5 : Incidence du sepsis entre 1979 et 2001 aux Etats-Unis en fonction du groupe ethnique des patients (5)

Plusieurs facteurs pourraient expliquer ces différences tels que le statut socio-économique (accès aux soins plus difficile pour les populations défavorisées), la qualité des établissements de soins fréquentés, certains polymorphismes génétiques ou la fréquence plus élevée de co-

morbidités particulières dans la population noire ou non blanche (ex. : infection par le virus de l'immunodéficience humaine [VIH], diabète, alcoolisme chronique etc.) (5, 32, 36-38).

2.4.4. Polymorphisme génique

La contribution du terrain génétique des patients vis-à-vis de leur réponse à une infection, leur risque de développer un sepsis ou d'en décéder a fait l'objet de nombreuses études. Les gènes qui ont été le plus étudiés sont ceux codant pour des molécules clés de l'immunité innée telles que le cluster de différenciation (CD) 14 (qui en association avec *Toll-like receptor* [TLR] 4 et *Myeloid differentiation protein 2* [MD2] forment le complexe du récepteur au LPS), les TLR (en particulier les TLR2 et TLR4), le *mannose-binding lectin* (molécule d'activation du système du complément), des cytokines telles que le *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), l'interleukine (IL)-1, l'IL-6, ou des médiateurs de la coagulation (39, 40). Les premières études menées s'intéressaient le plus souvent au polymorphisme nucléotidique simple d'un seul gène (*Single nucleotide polymorphism* [SNP], correspondant à la substitution d'une paire de bases par une autre (41)) pour lequel la fréquence de présentation entre des patients septiques et des contrôles sains était comparée. Une des limites de cette approche est le nombre important d'études à mener vu que près de 10 % des 30 000 gènes de l'homme sont impliqués dans la réponse immune. Avec les progrès technologiques, ce sont maintenant des centaines de SNP qui peuvent être génotypés rapidement en utilisant de faible quantité d'acide désoxyribonucléique (ADN) (40). La mise en évidence de certaines combinaisons de SNP pourrait permettre à terme d'identifier des groupes de patients à haut risque de mortalité, de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques ou de permettre une personnalisation des soins (42, 43). Cependant, une des difficultés de cette nouvelle approche réside dans la complexité et le nombre de données générées (44) et dans le manque de standardisation des études. En effet, il existe plusieurs sources de variations de l'expression génique qui peuvent rendre difficile l'interprétation des résultats telles que le délai entre le prélèvement sanguin analysé et le début du choc septique, l'analyse en sang total ou limitée à une sous-population leucocytaire (45). De plus, de nombreuses études manquent de puissance statistique (cohorte de patients et/ou de contrôles trop faible), rendant ainsi l'information qu'elles apportent discutable (46, 47). Une amélioration de la standardisation des études et de la qualité des méthodes statistiques utilisées semble nécessaire pour faciliter l'interprétation des résultats.

3. Etiologie

Les sites d'infection les plus fréquemment répertoriés sont les poumons puis l'abdomen et le tractus urinaire (6, 9, 12, 26). Depuis les années 1990, il semble que les infections d'origine pulmonaire aient une fréquence en augmentation, les infections urinaires en diminution et les infections d'origine abdominale une fréquence relativement stable (9). Cela a été confirmé dans une étude récente chez des patients en réanimation avec 64 % des infections localisées au niveau pulmonaire, 20 % au niveau abdominal, 20 % au niveau de la circulation sanguine et 14 % au niveau du tractus génito-urinaire (48).

Les bactéries les plus fréquemment répertoriées en service de réanimation sont *Escherichia coli* et *Pseudomonas spp* pour les bactéries à Gram négatif, et *Staphylococcus aureus* pour les bactéries à Gram positif (12, 15, 48). Bien qu'il y ait des variations à l'échelle locale, une évolution est observée concernant la prédominance générale des agents pathogènes responsables des états septiques. Alors que dans les années 1980, les bactéries Gram négatif étaient les plus fréquemment responsables des syndromes septiques, les bactéries Gram positif devenaient les plus communes dans les années 1990 (12, 15), étant par exemple responsables de 52,1 % des sepsis aux Etats-Unis en l'an 2000 (Figure 6) (5).

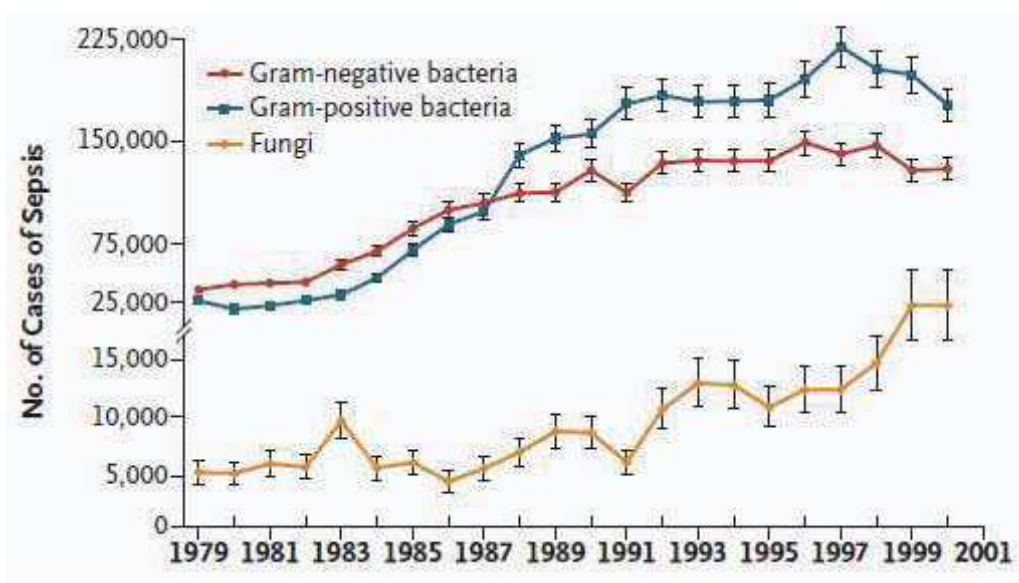


Figure 6 : Nombre de cas de sepsis aux Etats-Unis en fonction des microorganismes responsables entre 1979 et 2001 (5)

Les facteurs associés à cette augmentation des infections à Gram positif seraient l'utilisation plus fréquente des dispositifs médicaux intravasculaires, des procédures médicales invasives et des médicaments immunosuppresseurs (49). Cependant une étude récente réalisée en 2007 par Vincent *et al.* (*European Prevalence of Infection in Intensive Care II*) dans 1 265 services de réanimation de 75 pays du monde a révélé que les infections à Gram négatif étaient à

nouveau prédominantes : elles étaient responsables de 62 % des infections identifiées contre 47 % pour les bactéries à Gram positif (48). Une autre étude réalisée dans les hôpitaux italiens entre 2007 et 2008 a montré la même tendance : 47,4 % des infections répertoriées étaient dues à des bactéries Gram négatif contre 43,9 % pour les bactéries à Gram positif (50). Cette prédominance des bactéries à Gram négatif est problématique étant donné la tendance importante de ces microorganismes à sur-exprimer ou acquérir des gènes codant pour des mécanismes de résistance aux antibiotiques, en particulier dans des conditions de pression de sélection élevées (51). Il est à noter que la résistance des microorganismes aux antibiotiques devient un réel problème en milieu hospitalier étant donné le faible nombre de nouvelles molécules antibiotiques en développement (52). Une étude menée dans les services de réanimation parisiens a montré qu'entre 1993 et 2000, la proportion de bactéries multirésistantes comme *Pseudomonas spp* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) a augmenté significativement (9). Les SARM seraient responsables de plus de 25 % des bactériémies à *Staphylococcus aureus* dans un tiers des pays européens (données issues de *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*, **Figure 7**) (53).

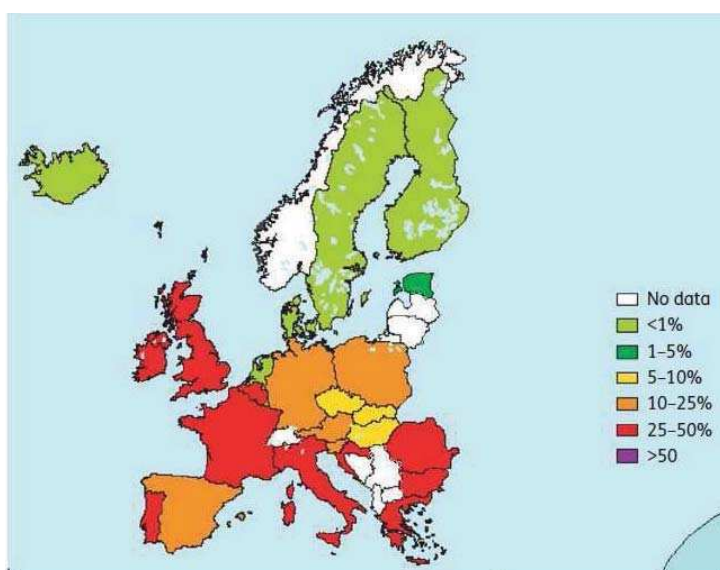


Figure 7 : Proportion de SARM parmi les bactériémies à *Staphylococcus aureus* dans les pays européens en 2002 (53)

Concernant les bactéries à Gram négatif, les β -lactamases codées par des éléments génétiques mobiles (plasmides et transposons, facilement transmissibles) co-existent souvent avec d'autres gènes de résistance comme les β -lactamases à spectre étendu, les résistances aux aminoglycosides ou aux quinolones. Certaines souches de *Klebsiella pneumoniae* ont par exemple été répertoriées comme résistantes à toutes les thérapeutiques disponibles actuellement (51).

Une autre évolution inquiétante dans la fréquence des agents responsables des états septiques concerne les microorganismes fongiques. Les infections à fungi connaissent une très forte augmentation (207 %) : ils étaient responsables de 5 231 cas de sepsis en 1979 contre 16 042 cas en 2000 (5). Dans l'étude récente de Vincent *et al.*, les fungi étaient présents chez 19 % des patients infectés avec une prédominance de *Candida spp* (48). De plus ces infections seraient associées à un risque accru de mortalité (OR = 1,81; IC95% 1,36-2,41 ; $p < 10^{-4}$) (9). Enfin les patients de réanimation présentent un risque important de développer des infections nosocomiales. Par exemple, près de 10 à 20 % des patients sous ventilation mécanique pendant plus de 48 heures développent des pneumonies induites (51). L'étude de Vincent *et al.* menée sur une journée dans plusieurs services de réanimation a montré que les patients hospitalisés en réanimation depuis une journée ou moins avaient une fréquence d'infection de 32 % et que cette fréquence dépassait 70 % pour les patients ayant un séjour de plus de 7 jours (48). Plusieurs études françaises ont montré que près de 50 % des épisodes septiques était d'origine nosocomiale pour les patients en sepsis sévère ou en choc septique (8, 54, 55).

4. Diagnostic du sepsis

Idéalement, le diagnostic du sepsis devrait être réalisé le plus tôt possible après admission du patient pour ne pas retarder sa prise en charge thérapeutique. Cependant le diagnostic du sepsis reste difficile : il repose sur la présence de certains signes cliniques non spécifiques (pouvant être présents en l'absence d'infection, Tableau 2) tels que la fièvre, et sur la mise en évidence d'une infection.

Tissue injury	Surgery/trauma Hematoma/venous thrombosis Myocardial/pulmonary infarction Transplant rejection Pancreatitis
Metabolic	Erythroderma Thyroid storm Acute adrenal insufficiency
Therapy related	Blood products Cytokines, especially granulocyte-macrophage colony-stimulating factor Anesthetic-related malignant hyperpyrexia, especially halothane Neuroleptic malignant syndrome, e.g., caused by haloperidol
Malignancy	Opiates/benzodiazepines Hypernephroma/lymphoma
Neurologic	Tumor lysis syndrome Subarachnoid hemorrhage

Tableau 2 : Exemples de pathologies non infectieuses pouvant être associées à un SIRS (56)

Tout d'abord, différentes causes non infectieuses peuvent induire un SIRS telles que des dommages tissulaires (ex. : post-traumatisme, post-chirurgie, post-infarctus myocardique etc.), des désordres métaboliques (ex. : problème thyroïdien), certaines thérapeutiques (ex. : syndrome malin des neuroleptiques) ou des atteintes malignes (ex. : syndrome de lyse tumorale, lymphome) (57). Dans une étude menée sur une population de 93 patients admis en réanimation, seuls 53 % des épisodes fébriles étaient associés à une infection, la cause la plus commune de fièvre sans état infectieux étant la fièvre post-opératoire (58). A l'inverse, des patients septiques, particulièrement les personnes âgées, ne développent pas de fièvre. Les manifestations précoces du sepsis sont alors des modifications des fonctions mentales, une augmentation des leucocytes circulants et du pourcentage de polynucléaires neutrophiles (PNN) ou une élévation de la glycémie (43).

Concernant le diagnostic d'infection, il peut être cliniquement évident (ex. : purpura fulminans, choc toxique staphylococcique) ou basé sur l'imagerie (51), dans le cas contraire, il repose essentiellement sur l'isolement du pathogène en cause à partir de prélèvements biologiques ou opératoires. Cependant la localisation du site de l'infection est parfois difficile, et l'interprétation des résultats microbiologiques peut être délicate (ex. : distinction entre colonisation et infection). Il est estimé que près de 30 % des cultures bactériologiques sont négatives (42, 48), ce qui peut s'expliquer notamment par la prise d'antibiotiques antérieure aux prélèvements, ou l'élimination rapide des bactéries hors du compartiment circulant (57). A cela s'ajoute le problème du délai de rendu des résultats bactériologiques : au moins 48 heures sont nécessaires pour obtenir un résultat sur la susceptibilité bactérienne aux antibiotiques. Pour palier à cela, des antibiotiques à large spectre sont en général administrés puis réajustés après analyse des résultats bactériologiques. Cependant cette pratique qui a pour but d'optimiser la prise en charge des patients, doit participer à la sélection de pathogènes résistants aux antibiotiques (59). L'utilisation de techniques de biologie moléculaire telles que la *polymerase chain reaction* (PCR) multiplex ou la spectrométrie de masse, devrait permettre d'améliorer la sensibilité de détection des microorganismes par rapport aux techniques de culture, de diminuer le délai de rendu des résultats à quelques heures et de raccourcir ainsi la durée de traitement par des antibiotiques à large spectre (59, 60). Un avantage important de ces techniques est aussi la détection plus rapide des microorganismes à croissance lente tels que les fungi qui sont de plus en plus fréquemment responsables d'infections chez les patients septiques (61).

Ainsi, le diagnostic de sepsis reste difficile avec les moyens actuellement disponibles. Les données biologiques via l'utilisation de biomarqueurs, pourraient constituer une alternative intéressante. De nombreuses recherches sont en cours dans ce but.

Plusieurs cytokines comme le TNF- α , l'IL-6 ou l'IL-1 ont été évaluées dans cette indication mais des résultats contradictoires ont été obtenus dans différentes études, et la sensibilité ou la spécificité de ces molécules n'étaient pas satisfaisantes pour le diagnostic infectieux (62). Une autre molécule qui a souvent été étudiée pour sa valeur diagnostique des infections est la protéine C réactive (CRP). C'est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation qui est produite majoritairement par le foie en réponse à l'IL-6. Sa concentration augmente dans les 4 à 6 heures après l'infection mais s'élève relativement lentement avec un pic entre 36 et 50 heures (63). La valeur diagnostique de la CRP a été évaluée dans plusieurs cohortes de patients avec dans certaines études, des performances très intéressantes (*Area under curve* [AUC] > 0,80 chez des patients avec une atteinte pulmonaire communautaire après analyse ROC [*Receiver operating curve*]) (64). Cependant l'augmentation de la CRP n'est pas spécifique d'une infection, par exemple une élévation de la CRP peut perdurer plusieurs jours chez des patients ayant subi une chirurgie (65). De nombreuses études ont comparé l'intérêt de la CRP et de la procalcitonine (PCT) dans le diagnostic de l'infection : le résultat le plus fréquemment obtenu est que les performances de la PCT sont supérieures (66, 67). La PCT est un peptide précurseur qui aboutit, après clivage de séquences peptidiques, à l'hormone calcitonine. Dans les conditions physiologiques normales, la calcitonine est produite principalement par les cellules neuro-endocriniennes thyroïdiennes. Par contre, lors d'une infection microbienne, l'expression du gène codant la calcitonine est induite de manière ubiquitaire dans les tissus parenchymateux (ex. : foie, poumons, reins, tissu adipeux, muscle) et aboutit à la libération de PCT qui peut ainsi être dosée dans le sang circulant (68). La cinétique de la PCT est intéressante car sa concentration sérique (très faible chez le sujet sain, <0,1 $\mu\text{g/L}$) augmente 4 heures après le début de l'infection bactérienne, avec un pic de concentration entre 8 et 24 heures (ce qui est plus précoce que la CRP), sa demi-vie est de l'ordre de 24 heures, et son élimination n'est pas modifiée en cas de dysfonction rénale (65, 69). De nombreuses études ont été menées pour évaluer la capacité de la PCT à distinguer un SIRS d'un sepsis mais ces études ont souvent inclus un nombre faible de patients (<200) et utilisaient des seuils décisionnels différents. Deux méta-analyses conduites en 2006 et 2007 ont donné des résultats contradictoires : la première (incluant 2 966 patients) a considéré la PCT comme un bon outil diagnostique pour les patients septiques, à ajouter dans la pratique clinique ; alors que la seconde (2 097 patients) a conclu que les performances de la PCT étaient limitées et ne permettaient pas de distinguer un SIRS d'un sepsis (70, 71). En 2001,

lors d'une conférence de consensus de l'« *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference* », les deux paramètres PCT et CRP ont été ajoutés dans la liste des critères diagnostiques du sepsis (lorsque leur concentration est supérieure à 2 fois l'écart-type par rapport aux valeurs normales) (4). Cet ajout illustre l'intérêt croissant qui est porté aux biomarqueurs pour leur aide dans le diagnostic du sepsis. Néanmoins comme la PCT peut être augmentée dans certaines conditions non infectieuses (ex. : chirurgie invasive, pancréatite), il serait peut-être plus intéressant d'utiliser la PCT pour sa valeur prédictive négative, pour exclure une infection bactérienne (65). Une autre utilisation envisagée pour la PCT serait sa mesure séquentielle (par exemple 2 ou 3 fois par semaine) chez les patients hospitalisés pour une longue durée, de façon à pouvoir identifier une augmentation de sa concentration qui marquerait, en complément de la clinique, le début d'une infection secondaire (65). Enfin, la PCT est également beaucoup étudiée pour son intérêt dans le suivi de l'efficacité de l'antibiothérapie (65).

D'autres molécules semblent prometteuses comme biomarqueur diagnostique du sepsis : c'est le cas de *Triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM-1, membre de la famille des immunoglobulines). L'expression de TREM-1 à la surface des PNN et des monocytes est fortement augmentée en cas d'infections bactériennes ou fongiques. Ce récepteur semble coopérer avec les TLR dans la production de la réponse pro-inflammatoire lors d'une infection. Une forme soluble (sTREM-1) résultant du clivage de la partie extracellulaire de TREM-1 peut être dosée dans le sang circulant ou dans d'autres liquides biologiques des patients septiques (72). Une première étude menée dans une cohorte de 148 patients sous ventilation mécanique avec une suspicion clinique d'infection pulmonaire avait donné de très bons résultats diagnostiques pour sTREM-1 dosé dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA). En effet, la valeur diagnostique avait été évaluée avec une AUC à 0,93 (IC95% 0,92-0,95 ; $p < 0,001$), une sensibilité à 98 % et une spécificité à 90 %. Dans un modèle multivarié, la présence de sTREM-1 dans le LBA était le prédicteur le plus intéressant de pneumonie (OR = 41,5, IC95% 20,9-77,6 ; $p < 0,001$) (73). Une méta-analyse conduite sur 13 études diagnostiques et 980 patients au total a confirmé ces premiers résultats avec une AUC à 0,91 (IC95% 0,88-0,93) et un OR diagnostique à 26,35 (IC95% 10,32-67,28) (74). D'après des études conduites récemment, la valeur diagnostique de sTREM-1 semble plus intéressante quand ce biomarqueur est dosé sur le site de l'infection présumé (ex. : LBA) par rapport à son dosage au niveau plasmatique (72). Les résultats encourageants de sTREM-1 restent à confirmer dans des études interventionnelles.

La mesure de l'expression du CD64 à la surface des PNN est une autre approche qui semble prometteuse (75). En effet, son expression est induite lors d'une infection et est ainsi plus

élevée chez les patients septiques par rapport aux patients non infectés (76). Dans une étude incluant 109 patients hospitalisés, l'AUC du CD64 pour différencier les patients non infectés des patients infectés était de 0,943 (IC95% 0,919-0,967 ; $p < 0,001$) (77).

Dans une revue récente de Pierrakos *et al.*, 34 biomarqueurs ont été répertoriés dans la littérature comme outil diagnostique potentiel du sepsis dont 16 évalués spécifiquement pour son diagnostic précoce (78). Aucune molécule n'avait une sensibilité et une spécificité suffisante pour pouvoir être utilisée en routine. Ainsi les nombreuses recherches conduites, bien que n'ayant toujours pas abouti à une utilisation en pratique courante, attestent du réel besoin de trouver un ou des biomarqueur(s) permettant de diagnostiquer précocement les états septiques.

5. Physiopathologie des syndromes septiques

5.1. Phase pro-inflammatoire

5.1.1. Mécanismes responsables

Le point de départ de l'état septique est la colonisation d'un organe, compartiment ou fluide de l'organisme par un microorganisme pathogène ou potentiellement pathogène, induisant d'abord une réaction inflammatoire locale (4). Au niveau tissulaire, les macrophages résidents et les cellules dendritiques constituent la première ligne de défense contre les microorganismes (79, 80). Ces cellules immunitaires détectent la présence des microorganismes par l'intermédiaire de récepteurs particuliers – les *Pattern Recognition Receptors*, dont les plus connus sont les TLR – qui reconnaissent des motifs présents sur la grande majorité des bactéries, virus ou champignons : les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (**Figure 8**) (81, 82). Sur le site de l'infection, les alarmines, molécules endogènes libérées par les cellules altérées de l'hôte, peuvent également activer les TLR et transmettre ainsi un signal de danger interne (83, 84).

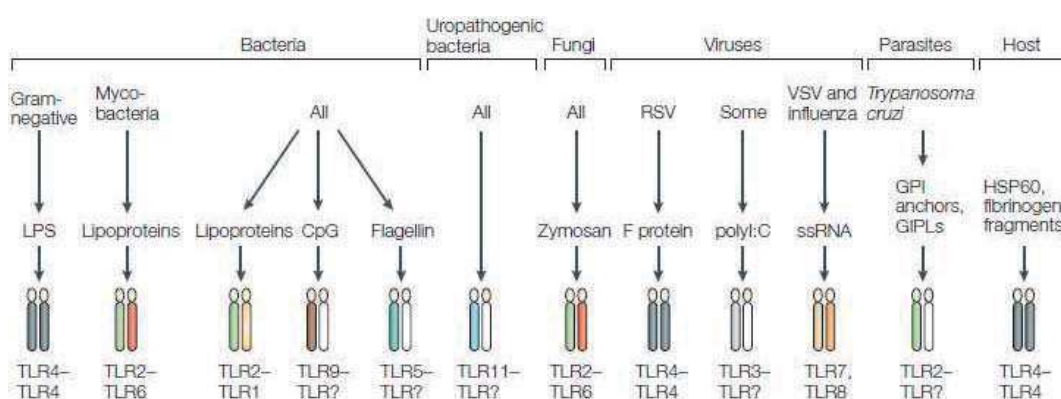


Figure 8 : Exemples de molécules exogènes et endogènes reconnues par les TLR (85)

GPI : glycosylphosphatidylinositol, HSP60 : heat-shock protein 60, polyI:C : double-stranded RNA, RSV : respiratory syncytial virus, ssRNA : single-stranded viral RNA, VSV : vesicular stomatitis virus.

L'activation par les TLR initie une cascade de réactions aboutissant à la translocation du *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) au niveau de certains gènes (86). Par cette voie, les macrophages secrètent ainsi rapidement des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , et des chimiokines comme l'IL-8 (87, 88). Les effets complémentaires de l'IL-1 β et du TNF- α (qui stimulent la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales), et de la chimiokine IL-8, permettent le recrutement d'autres leucocytes, en particulier les PNN (87). Leur fonction principale est de tuer les agents pathogènes phagocytés via la libération de granules contenant des molécules de dégradation des bactéries, et la formation de dérivés actifs de l'oxygène (89, 90). D'autres composés de la réponse innée participent également au processus de défense de l'hôte : le système du complément avec ses multiples implications (ex. : opsonisation, lyse des microorganismes, chimiotactisme des cellules phagocytaires via les anaphylatoxines C3a et C5a (91, 92)) ainsi que les protéines de la phase aiguë de l'inflammation (ex. : protéine C réactive, *Serum amyloid A* (93, 94)).

La réponse immunitaire adaptative intervient aussi dans la résolution de l'infection. Pour cela, les antigènes microbiens sont transportés par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) vers les organes lymphoïdes secondaires les plus proches du site de l'infection. Les antigènes sont apprêtés et présentés par les CPA aux lymphocytes T naïfs qui recirculent continuellement au travers des organes lymphoïdes. Cette présentation entraîne l'activation des lymphocytes spécifiques et leur migration vers le site de l'infection où se met alors en place l'immunité à médiation cellulaire. Certains lymphocytes restent dans les organes lymphoïdes afin de participer à l'immunité à médiation humorale en activant les lymphocytes B spécifiques de l'antigène (95).

Le type de réponse qui va se développer est déterminé schématiquement par la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes *T helper* (Th) 1 (favorisant l'immunité à médiation cellulaire) ou Th2 (favorisant l'immunité à médiation humorale). Cette différenciation est régulée par le type de cytokines produites par les cellules de l'immunité innée et par les caractéristiques de l'antigène reconnu. La réponse de type Th1 est induite principalement par l'interféron-gamma (IFN- γ) sécrété par les cellules Th1 et par l'IL-12 produite par les CPA. Elle s'accompagne de l'activation des lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques et des monocytes. La réponse de type Th2 est déclenchée par la sécrétion d'IL-4 et par l'expression du CD40 ligand à la surface des macrophages et des lymphocytes T. Elle permet l'activation des lymphocytes B sécrétant des immunoglobulines dirigées contre les constituants des microorganismes et/ou leurs toxines (96, 97). Idéalement, la réponse immunitaire adaptative permet la résolution de l'infection et induit chez l'hôte un état de mémoire immunitaire le protégeant contre toute nouvelle infection par le même pathogène.

Chez certains patients, la réaction inflammatoire initialement locale peut se généraliser, ce qui correspond au stade du sepsis. Cette généralisation de la réaction va induire une forte production de médiateurs inflammatoires : des amines vasoactives (ex. : histamine, sérotonine), des peptides vasoactifs (ex. : bradykinine, substance P), des fragments du complément (ex. : C3a, C5a), des médiateurs lipidiques (ex. : prostaglandines, leucotriènes), des cytokines (**Figure 9**), des chimiokines et des enzymes protéolytiques (ex. : *matrix metalloproteinase*) (98). Le passage au niveau systémique de certains de ces composés participe à l'amplification de la réponse immune. Les cytokines jouent un rôle particulier. Elles peuvent être produites et agir sur de très nombreuses cellules (d'origine hématopoïétique ou non) (99), elles peuvent auto-entretenir leur production par le jeu des cascades cytokiniques (une cytokine pouvant induire sa propre synthèse ou celle d'une autre cytokine) (100) et avoir des effets non seulement additifs mais synergiques entre elles (101). Un véritable « orage cytokinique » peut se déclencher (102). L'anaphylatoxine C5a en quantité excessive (103) ou des cytokines nouvellement étudiées comme *Macrophage migration inhibitory factor* (104) et *High-mobility group box 1* (105) participent aussi à la potentialisation de la réaction pro-inflammatoire.

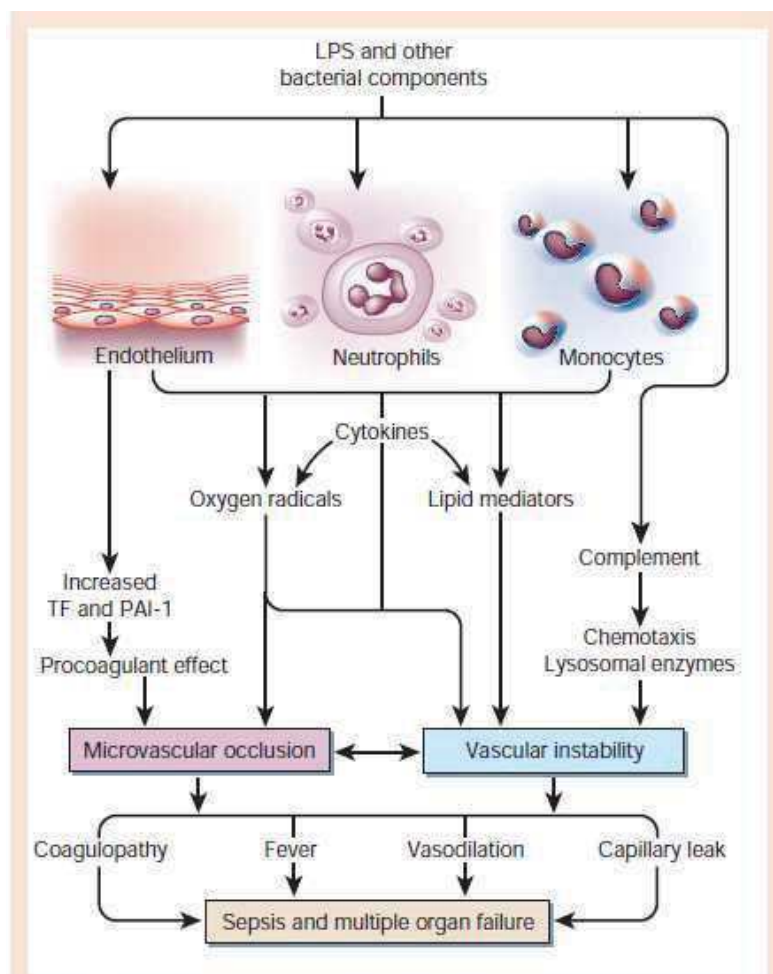


Figure 9 : Mécanismes d'amplification de la réponse immunitaire à l'infection (106)

5.1.2. Défaillance d'organe multiviscérale

La généralisation de la réponse immunitaire a diverses conséquences au niveau de l'organisme. Les cytokines libérées au niveau systémique peuvent provoquer des lésions sur des organes situés même à distance du site de l'infection, via l'activation des cellules endothéliales et des cellules inflammatoires présentes dans ces organes (**Figure 9**) (102, 106). L'endothélium, en contact direct avec les médiateurs plasmatiques, constitue une des premières cibles des cytokines circulantes (107). Certaines cytokines jouent aussi un rôle dans la défaillance myocardique des patients en choc septique (108). Ainsi, le système cardio-vasculaire dans son ensemble est touché par la réponse inflammatoire systémique. Près de 56 % des patients en sepsis sévère développent une défaillance de ce système dans les 24 heures après leur admission en service de réanimation (8). Une étude post-mortem réalisée chez des patients ayant développé un sepsis sévère ou un choc septique après une chirurgie a montré qu'une altération du système cardio-vasculaire était présente chez 53,6 % des patients et que dans 35,3 % des cas, le décès était attribué à une défaillance incontrôlée de ce système (109). De plus, coagulation et inflammation sont deux processus intimement liés, l'un pouvant activer l'autre et vice versa (110). A l'échelle systémique, l'activation massive du système immunitaire induit des troubles de la coagulation se traduisant par la formation de thrombi intravasculaires, pouvant provoquer une coagulation intravasculaire disséminée, compromettre la perfusion des tissus et donc amplifier les défaillances multi-viscérales (110).

Le système immunitaire et le système nerveux communiquent entre eux de manière bidirectionnelle par l'intermédiaire de neurotransmetteurs, de neuropeptides et de cytokines (111). Lors d'un épisode infectieux sévère, la forte réaction inflammatoire induit une réponse de stress. Cela a pour conséquence une activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et du système nerveux autonome sympathique et parasympathique, induisant une production de molécules immunomodulatrices et vasoactives (ex. : corticoïdes et catécholamines) (112-114).

Ainsi, l'amplification de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'agent infectieux, via le jeu des interactions multiples entre les différents systèmes de l'organisme, a des conséquences délétères au niveau de nombreux organes (système nerveux central, système respiratoire, hépato-splanchnique, rénal et cardio-vasculaire) (102, 115). Les dommages cellulaires induits provoquent des dysfonctions d'organes même à distance du foyer infectieux initial, conduisant ainsi au sepsis sévère voire au choc septique (**Figure 10**) (115).

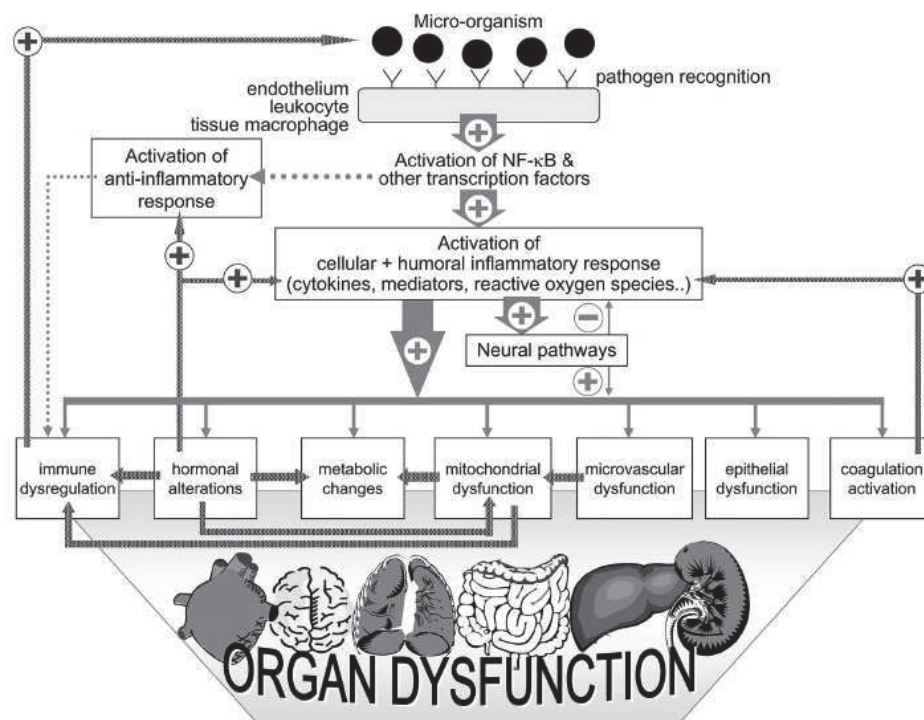


Figure 10 : Les multiples dysfonctions d'organes pouvant se mettre en place lors du choc septique (115)

Plus le nombre d'organes défaillants est important, plus la mortalité augmente (**Figure 11**) (12, 106). Il est à noter qu'au niveau histologique, les organes dysfonctionnels ne présentent que peu d'anomalie de structure en comparaison des altérations observées (116). La dysfonction des organes serait donc plutôt liée à une perte de leur fonction (perte qui peut être réversible) (117). Brièvement, une des hypothèses avancées pour expliquer cette perte de fonctionnalité observée est une baisse de l'utilisation de l'oxygène et une réduction de l'activité mitochondriale (117, 118). Certains auteurs considèrent que l'organisme entre dans un état d'« hibernation » pour faire face à l'agression infectieuse massive, ce qui se traduit par une baisse de sa consommation en oxygène et de sa demande en adénosine triphosphate (ATP) de façon à ne maintenir que les fonctions minimales nécessaires à sa survie (117, 119). Un état d'hibernation myocardique a notamment été décrit lors du choc septique (120).

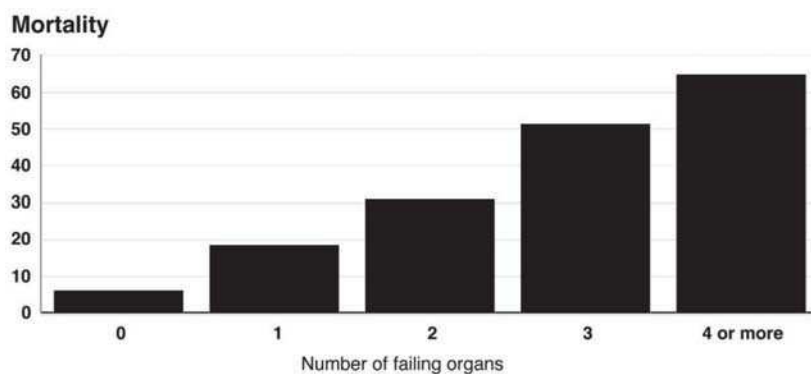


Figure 11 : Pourcentage de mortalité des patients septiques en fonction du nombre d'organes défaillants (12)

Compte tenu de la nature de notre travail personnel sur les pro-hormones vasoactives, nous décrivons plus en détail la défaillance cardio-vasculaire dans le paragraphe suivant.

5.1.3. Dysfonction du système cardio-vasculaire lors du choc septique

La défaillance cardio-vasculaire et le choc sont les premières conséquences cliniquement mesurables du choc septique. Cette défaillance est une cause importante de mortalité à la phase précoce du choc septique (109).

5.1.3.1. Physiopathologie de la défaillance cardio-vasculaire lors du choc septique

Au stade précoce du choc septique ou après un remplissage vasculaire adéquat, les patients développent un état hyperdynamique avec effondrement des résistances vasculaires périphériques, associé à un débit cardiaque normal ou élevé, et à une pression artérielle abaissée (121). Ces dysfonctions sont le résultat d'une atteinte du système vasculaire et du système cardiaque.

5.1.3.1.1. Atteinte du système endothélial

Physiologiquement, l'endothélium est un véritable organe à part entière, qui joue un rôle majeur dans les fonctions de contrôle du tonus vasomoteur, le trafic des cellules et des nutriments ou le maintien de la fluidité du sang (122, 123). L'atteinte du système endothélial est donc un élément clé de la physiopathologie du choc septique. En effet, l'endothélium, stratégiquement situé entre les tissus et le sang circulant, est à la fois cible et acteur des mécanismes aboutissant aux dysfonctions vasculaires observées. Ces dysfonctions peuvent être décomposées en dysfonction microvasculaire, hyporéactivité vasculaire aux stimuli vasoconstricteurs et dysfonction endothéliale (124).

Tout d'abord, la perfusion microvasculaire, qui a comme objectif d'équilibrer l'apport tissulaire de l'oxygène et des nutriments aux besoins tissulaires, est fortement compromise lors du sepsis (125). Plusieurs mécanismes y participent : l'écoulement perturbé du sang par diminution de la déformabilité des globules rouges (126), l'augmentation de l'agrégabilité des PNN par augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (**Figure 12**) (127, 128), ou la formation de microthrombi par stimulation de la cascade de la coagulation (110, 129). A cela s'ajoutent une production très importante de monoxyde d'azote (NO) par les NO-synthases inductibles (NOSi), cause majeure d'hypotension lors du choc septique (107) et une dysfonction des mécanismes d'autorégulation vasculaire, responsable d'une hétérogénéité de

la perfusion de la microcirculation (130). Un shunt de la microcirculation est également décrit, le transport de l'oxygène étant redirigé directement du compartiment artériel au compartiment veineux (131). L'ensemble de ces mécanismes maintient ainsi les tissus dans un état d'hypoxie. En réponse à la diminution d'apport de l'oxygène, les fonctions mitochondriales semblent se réduire afin de diminuer la consommation cellulaire en oxygène, ce qui pourrait contribuer aux dysfonctions d'organes des patients septiques (119, 132).

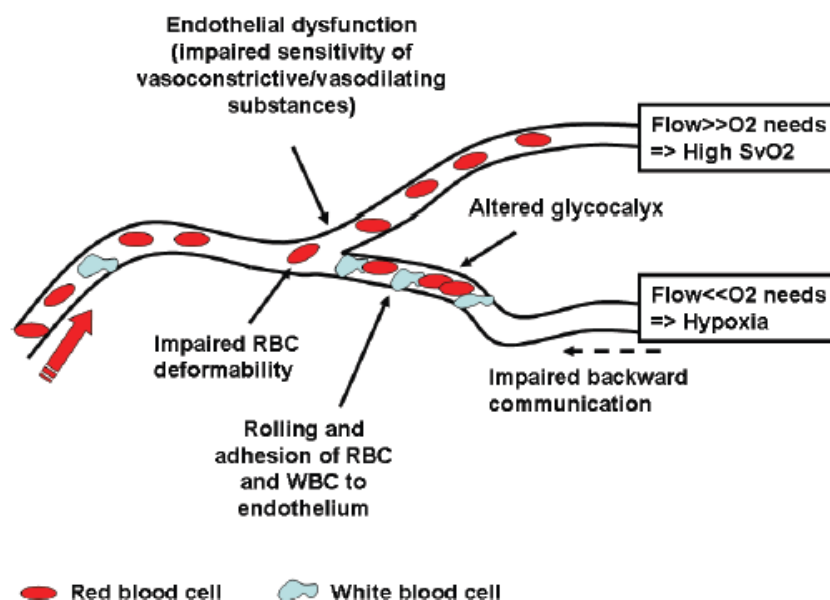


Figure 12 : Mécanismes participant à l'altération de la perfusion microvasculaire au cours du sepsis (128)

Lors du sepsis, il existe une réponse réduite aux stimuli vasoconstricteurs tels que les catécholamines circulantes (pourtant présentes à fortes concentrations sanguines lors du sepsis) ou l'angiotensine II (133). Cette hyporéactivité vasculaire est multifactorielle. Elle pourrait être due à une diminution du nombre de récepteurs adrénergiques alpha-1 ou à un découplage dans la cascade d'activation de ces récepteurs (133). Elle serait également favorisée par la production importante de molécules vasodilatatrices comme le NO et la prostaglandine PGI₂ ; ou celle du peroxynitrite résultant de l'interaction entre le NO et l'anion superoxyde (133). Cette production accrue de NO et de peroxynitrite, ainsi que l'état d'hypoxie et d'acidose présents au cours du choc septique, activeraient excessivement le canal K⁺ ATP-dépendant au niveau vasculaire (canaux jouant un rôle majeur dans la polarisation des membranes cellulaires), créant alors une hyperpolarisation membranaire des cellules endothéliales, responsable de vasodilatation (Figure 13) (133).

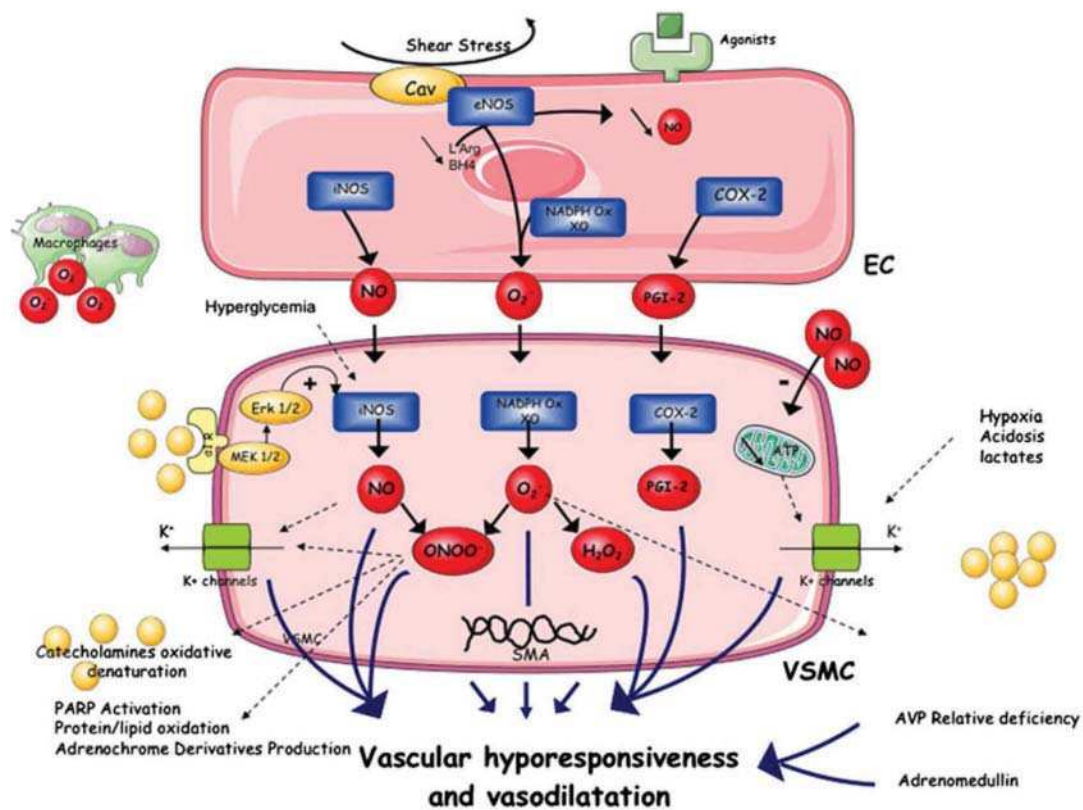


Figure 13 : Différents mécanismes participant aux dysfonctions vasculaires lors des états septiques (133)

BH4 : 5,6,7,8-tetrahydrobiopterine, Cav : caveolin-1, COX-2 : cyclooxygénase-2, EC : endothelial cell, Erk : extracellular signal-regulated kinases, L-Arg : L-arginine, MEK : mitogen-activated protein kinase, NADPH Ox : oxy nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, O₂⁻ : superoxide anions, ONOO⁻ : peroxynitrite, PARP : poly(ADP-ribose) polymerases VSMC : vascular smooth muscle cell

Des dysfonctions endothéliales sont présentes lors des épisodes septiques résultant de lésions directes des cellules endothéliales. Tout d'abord, en réponse au LPS bactérien ou à certaines cytokines (TNF- α ou IL-1 β), les cellules endothéliales s'activent et expriment des molécules d'adhésion permettant l'ancrage des PNN à leur surface puis leur diapédèse dans les tissus sous-jacents. Cette accumulation bénéfique pour l'élimination des agents infectieux peut avoir des effets tissulaires délétères via la production de protéases et de radicaux libres de l'oxygène (107). De tels radicaux peuvent être produits par les cellules endothéliales elles-mêmes après exposition à des cytokines comme l'IL-1 ou l'IFN- γ , ainsi que des dérivés actifs du NO (ex. : peroxynitrite) (134). Les molécules oxydantes produites, en modifiant la structure des cellules endothéliales, altèrent l'intégrité de la barrière endothéliale, favorisant ainsi l'augmentation de la perméabilité endothéliale (134), déjà augmentée par le processus inflammatoire (98). De plus, les radicaux libres ainsi que des médiateurs inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-1 ou l'interféron, induisent une apoptose des cellules endothéliales, et leur détachement de la membrane basale, aggravant ainsi la rupture de la barrière endothéliale

(107, 135). Il résulte de ces mécanismes une fuite plasmatique dans le compartiment interstitiel contribuant à l'hypovolémie observée et la formation d'œdèmes, favorisant le défaut d'extraction de l'oxygène, et donc la souffrance tissulaire (124, 130, 135).

5.1.3.1.2. Atteinte du myocarde

Au niveau myocardique, la clinique est trompeuse vis-à-vis des dysfonctions associées au choc septique. En effet, bien que le débit cardiaque soit normal ou augmenté chez le patient en choc, une dysfonction des deux ventricules est présente simultanément. Concernant la fonction systolique d'une part, les ventricules gauche et droit sont dilatés, avec une fraction d'éjection réduite (**Figure 14**). Ces anomalies, surtout présentes chez les patients qui survivent au choc, sont réversibles après 7 à 10 jours. D'autre part, la fonction diastolique des deux ventricules serait également perturbée, probablement par baisse de la compliance du myocarde (136-138).

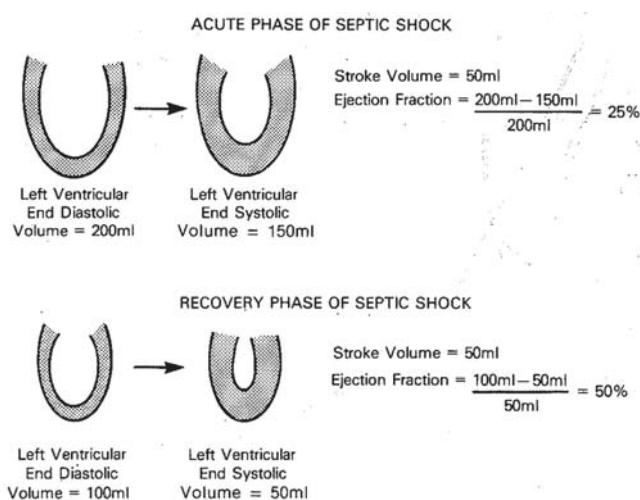


Figure 14 : Modifications des performances myocardiques à la phase aiguë et à la phase tardive du choc septique (136)

Des mécanismes présents à différents niveaux (systémique, local et cellulaire) semblent expliquer les dysfonctions du myocarde observées (**Figure 15**). Tout d'abord, au niveau local, la mise en évidence d'un fort débit sanguin coronaire et d'une baisse de la consommation de l'oxygène par le myocarde, ont permis d'écarter l'hypothèse d'une ischémie globale du myocarde (139). Au niveau systémique, de nombreuses recherches ont porté sur la mise en évidence de molécules circulantes pouvant diminuer les fonctions myocardiques. Il a été montré que le sérum de patients septiques, mis en contact *in vitro* avec des myocytes, pouvait réduire leur contractilité de manière concentration-dépendante (140). Plusieurs molécules sont

potentiellement mises en cause, en particulier le TNF- α et l'IL-1 β (qui pourraient avoir un effet synergique), d'autres cytokines (IL-6), ou l'anaphylatoxine C5a du complément (108, 137, 141-143). Cependant, bien qu'à la phase précoce du choc les cytokines semblent jouer un rôle important dans la dépression myocardique, elles ne peuvent expliquer à elles seules le maintien de ces dysfonctions dans le temps, vu que leur concentration se normalise (144). Néanmoins, la production de molécules secondairement induites par les cytokines (ex. : NO ou prostanoïdes) pourrait expliquer le prolongement de l'effet des cytokines (144). Un autre élément pouvant participer à la cardiomyopathie septique est une dysfonction de la régulation autonome suite à l'apoptose de neurones des centres autonomes de la régulation cardiovasculaire (145, 146), ainsi qu'un défaut de la signalisation adrénergique notamment par diminution de la densité des récepteurs β -adrénergiques et une augmentation de l'expression de protéines G inhibitrices réduisant l'activité de l'adénylate cyclase (138, 145, 146).

Au niveau cellulaire, la contractilité et la relaxation myocardique sont régulées par l'interaction entre des protéines contractiles (actine, myosine), des protéines régulatrices (troponine, tropomyosine) et les ions calcium (108). Lors du choc septique, la baisse de la contractilité des cardiomyocytes pourrait s'expliquer par une altération des courants calciques et une baisse de la sensibilité des myofilaments au calcium (138, 146). Ces modifications seraient dues à une densité réduite de récepteurs calciques (en particulier récepteur à la ryanodine et canaux calciques type-L (145, 146)) et à une modification de l'état de phosphorylation de protéines clés de la contractilité telles que la troponine I (138, 147). De plus, cette baisse de la sensibilité calcique des myofilaments serait associée à une augmentation de la longueur des cardiomyocytes et à la distension de la paroi ventriculaire, et pourrait expliquer la dilatation ventriculaire observée lors du choc (138). L'homéostasie calcique est aussi liée aux fonctions mitochondriales, qui sont altérées lors du choc septique. En effet, le fonctionnement du canal calcique *Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase* consomme de l'ATP pour pomper le calcium intracellulaire vers le réticulum sarcoplasmique (108). Or, lors du sepsis, les mitochondries des cardiomyocytes présenteraient des dommages structuraux (142, 145) et un transport réduit des électrons par les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale, réduisant ainsi la production d'ATP (108, 142). Ce mécanisme pourrait participer à l'altération de l'homéostasie calcique.

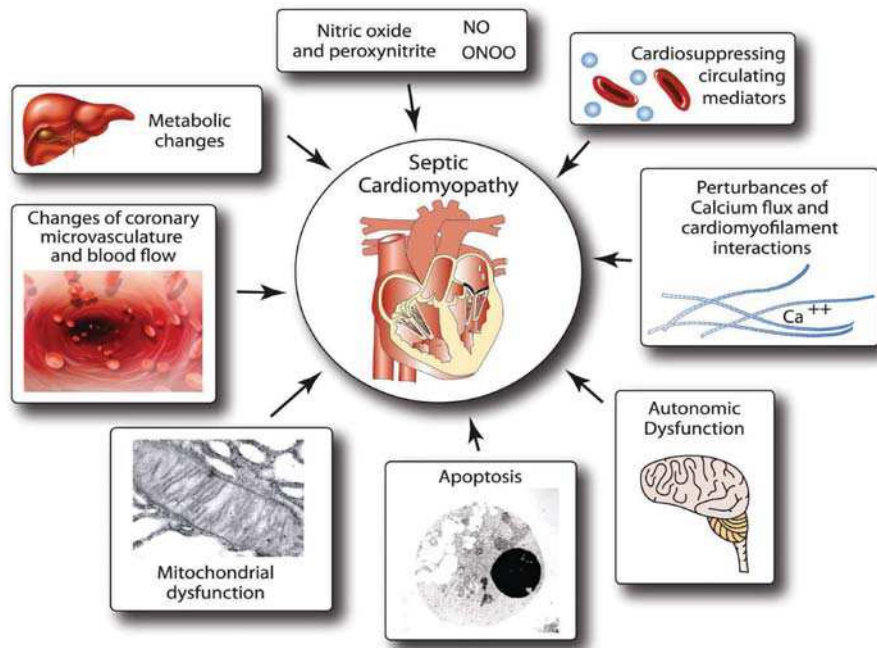


Figure 15 : Mécanismes impliqués dans les dysfonctions myocardiques lors des états septiques (145)

Un état d'hibernation myocardique a été décrit lors du choc septique (120) et constituerait une réponse adaptative, en diminuant les dépenses énergétiques dans ce contexte de production énergétique réduite (145). Une activation des caspases a été observée lors du choc, mais l'apoptose des cardiomyocytes semble jouer un rôle relativement mineur dans les dysfonctions myocardiques : la mort des cellules cardiaques est rarement décrite (146) et semble peu compatible avec une restauration des fonctions myocardiques dans les 10 jours après le choc chez les survivants (138).

Enfin, le rôle du NO est quelque peu controversé dans la dysfonction myocardique du choc, ayant à la fois des effets délétères et protecteurs. Le NO peut être produit par toutes les cellules du myocarde via l'activation des NO-synthases constitutives (NOSc) – NOS 1 (NOS neuronale) et NOS 3 (NOS endothéliale) – ou de la NOS 2 inductible (NOSi) (141). Les dysfonctions myocardiques seraient en partie dues à la production importante de NO par les NOSc à la phase précoce du choc ; alors qu'à la phase plus tardive, les NOSi seraient en cause (137, 142). Produit en grande quantité, le NO peut induire l'apoptose des cardiomyocytes (148), entrer en compétition avec l'oxygène au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire, et ainsi augmenter la production de dérivés actifs de l'oxygène (138). Certains des effets délétères du NO seraient médiés par le peroxynitrite qui, par son effet dénaturant des protéines, perturbe le flux calcique, la respiration mitochondriale et ainsi la contractilité cardiaque (138). Cependant, le NO a aussi des effets protecteurs, notamment en induisant une

vasodilatation des vaisseaux coronaires favorisant ainsi l'apport sanguin au myocarde, ou en augmentant la compliance ventriculaire, facilitant alors le remplissage ventriculaire (146).

5.1.3.2. Intérêt des biomarqueurs

De très nombreux médiateurs sont libérés dans le sang circulant lors d'un état septique. Près de 180 biomarqueurs ont déjà été étudiés (78). Lors du choc septique, défini par une souffrance cardio-vasculaire, les médiateurs d'origine cardio-vasculaire ou reflétant des anomalies des fonctions cardio-vasculaires constituent des biomarqueurs d'intérêt. Plusieurs ont déjà été étudiés tels que le *Brain Natriuretic Peptide* (BNP), le *N Terminal-proBNP* ou les troponines cardiaques (troponine T et I). Des résultats intéressants ont été obtenus en termes de détection de la dysfonction myocardique et de prédiction de la mortalité de patients septiques (149). Cependant de nombreuses études ont été menées sur des petites cohortes de patients (149), et des facteurs autres que cardiaques peuvent influencer sur la libération de ces marqueurs, en particulier pour le BNP (150). La recherche de marqueurs alternatifs à ces derniers est donc justifiée.

Dans le cadre d'une collaboration avec la société BRAHMS[®], nous avons étudié quatre précurseurs d'hormones vasoactives au cours du choc septique : la pro-endothéline-1, la pro-vasopressine, la pro-adrénomédulline et le pro-peptide natriurétique auriculaire. Nous les décrivons en détail dans la partie suivante.

5.1.3.2.1. Physiopathologie et pharmacologie des hormones vasoactives

5.1.3.2.1.1. Endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1) est principalement produite par les cellules endothéliales mais les cellules épithéliales de l'arbre respiratoire, les macrophages ou les cardiomyocytes peuvent également la produire (151). L'ET-1 est synthétisée de manière constitutive dans la plupart de ces cellules. Elle peut aussi être libérée après activation des cellules endothéliales à partir de vésicules de stockage (152). L'ET-1 dérive du préproET-1 qui est clivé par une endopeptidase pour former le préET-1 puis le Big ET-1. Ces intermédiaires inactifs sont ensuite clivés par une famille d'*endothelin-converting enzymes* pour former l'ET-1 mature (152).

L'ET-1 peut se fixer à deux récepteurs (couplés à des protéines G) : ETA et ETB présents dans de nombreux tissus de l'organisme : cellules musculaires lisses vasculaires, cardiomyocytes, hépatocytes, cellules des tubes collecteurs rénaux, etc. Seul ETB serait présent sur les cellules endothéliales (**Figure 16**) (151, 153). L'ET-1 est une puissante hormone vasoconstrictrice dont l'effet est médié par les récepteurs ETA et ETB. L'ET-1 peut

aussi induire un effet vasodilatateur après fixation au récepteur ETB présent sur les cellules endothéliales via la production de NO (154).

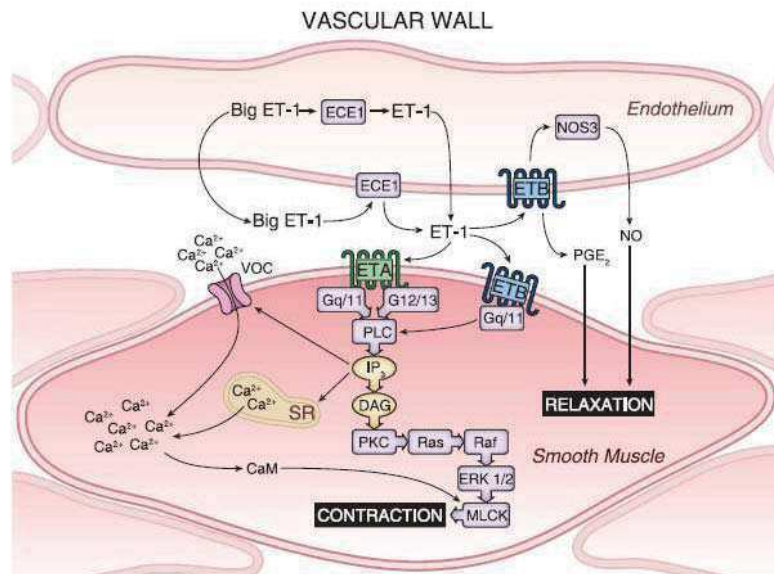


Figure 16 : Représentation schématique des récepteurs à l'ET-1 au niveau vasculaire (153)

CaM : calmodulin, DAG : diacylglycerol, ECE : endothelin converting enzymes, ERK : extracellular signal-regulated kinase, IP₃ : inositol trisphosphate, MLCK : myosin light-chain kinase, PKC : protein kinase C, PLC : phospholipase C, SR : sarcoplasmic reticulum, VOC : voltage-operated Ca²⁺ channel

La demi-vie plasmatique de l'ET-1 est très courte : moins de 5 minutes, étant rapidement éliminée au niveau pulmonaire (154).

Lors du sepsis ou du choc septique, la concentration plasmatique en ET-1 est augmentée par rapport à des sujets sains (155, 156). Il a été montré en culture que la synthèse de l'ARN messager (ARNm) de l'ET-1 peut être induite par diverses molécules dont des cytokines (TNF- α , *Transforming Growth Factor-beta* [TGF- β], interleukines) ou la noradrénaline (151), tous produits au cours du choc septique. L'ARNm de la préproET-1 peut être induit par l'endotoxine dans des modèles animaux (157). Lors du choc septique, l'ET-1 pourrait jouer un rôle à plusieurs niveaux tels que l'hétérogénéité du flux sanguin régional, l'adhésion des PNN aux cellules vasculaires, la production de dérivés actifs de l'oxygène ou l'augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale (157).

5.1.3.2.1.2. Vasopressine

La vasopressine (AVP, ou hormone anti-diurétique) est synthétisée par les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus sous forme de préproAVP (158). Au cours de son transport, via l'axone de ces neurones jusqu'à la post-hypophyse, l'AVP est séparée de ses peptides précurseurs puis stockée dans des vésicules. Les principaux stimuli qui induisent la

libération de l'AVP dans la circulation systémique sont une hypotension sévère, une hypovolémie ou des conditions hypertoniques (159). Ainsi l'AVP peut être considérée comme une hormone de stress, agissant pour maintenir l'homéostasie du milieu interne (158). L'AVP a deux rôles majeurs : le plus important est la régulation de l'équilibre hydrique avec un effet anti-diurétique, et un rôle dans la régulation de la pression artérielle avec un effet vasoconstricteur (peu mis en jeu dans les conditions physiologiques normales où les systèmes sympathique et rénine-angiotensine sont fonctionnels) (158, 160). Les actions de l'AVP sont médiées par la fixation à différents récepteurs qui appartiennent à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G : le récepteur V1 (anciennement V1a) fortement exprimé sur les cellules musculaires lisses vasculaires et qui une fois activé, induit une vasoconstriction ; V2 fortement exprimé sur les tubules collecteurs rénaux, qui après activation, induit une augmentation de la réabsorption de l'eau au niveau du canal collecteur via la mise en jeu de récepteurs à l'aquaporine 2 (**Figure 17**) ; V3 au niveau pituitaire (anciennement V1b) dont l'activation peut induire la sécrétion d'adrénocorticotrophine par les cellules pituitaires antérieures ; le récepteur à l'ocytocine (pouvant lier AVP ou l'ocytocine) présent sur une grande variété cellulaire, et pouvant induire au niveau cardiaque la libération du peptide natriurétique auriculaire (ANP), et au niveau de l'endothélium vasculaire une vasodilatation NO-dépendante (161). L'activité vasoconstrictrice de l'AVP au niveau vasculaire peut aussi être médiée par sa capacité à potentialiser l'effet d'autres molécules vasoconstrictrices comme la noradrénaline ou l'angiotensine II, la modulation des canaux K^+ ATP-dépendants, ou en s'opposant à l'augmentation du Guanosine monophosphate cyclique induite par le NO (162).

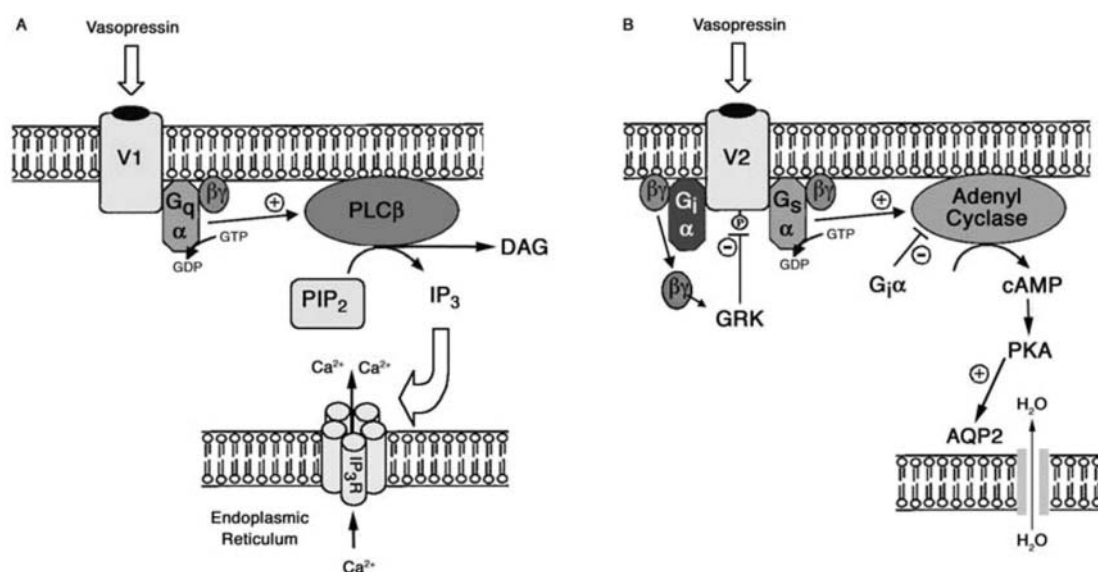


Figure 17 : Représentation schématique de la signalisation intracellulaire induite par la fixation de l'AVP aux récepteurs : (A) V1 et (B) V2 (163)

AQP-2 : aquaporin-2, cAMP : cyclic adenosine monophosphate, DAG : diacylglycerol, IP3 : inositol (1,4,5)-triphosphate, IP3R : IP3 receptor, PIP2 : phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate, PKA : protein kinase A, PLCb : phospholipase Cb

La demi-vie de l'AVP est courte : 4 à 30 minutes en fonction des études, l'hormone étant rapidement métabolisée au niveau du foie et du rein par des vasopressinases (158, 159).

Chez les patients septiques, la concentration en AVP semble suivre une réponse biphasique : au cours des premières heures, la concentration est augmentée par rapport aux valeurs physiologiques (164). Endotoxine et cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β et IL-6, pourraient induire la libération d'AVP (163). Cependant, lorsque le choc persiste, il a été décrit une baisse de la concentration en AVP, avec retour à des valeurs physiologiques malgré une pression artérielle basse (164-166). Les patients présentent alors une insuffisance relative en AVP, qui pourrait contribuer à la vasodilatation observée chez les patients en choc septique (164, 166). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette insuffisance relative : une déplétion des vésicules de stockage de l'AVP, une diminution des signaux stimulant la libération d'AVP (anomalie de régulation par les barorécepteurs ou les osmorécepteurs, liquide de remplissage inhibant les volorécepteurs auriculaires) ou une inhibition de la libération d'AVP (effet inhibiteur du NO ou des fortes concentrations de noradrénaline circulante) (159, 167).

5.1.3.2.1.3. Adrénomédulline

L'adrénomédulline (ADM) est un membre de la famille des peptides regroupant calcitonine, *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) et amyline (168). L'ADM dérive de la préproADM, et est clivée en proADM, lui-même précurseur de l'ADM mature et du *proADM N-terminal 20 peptide* (169). L'ADM est produite dans plusieurs tissus : les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires principalement, et les glandes surrénales, le cœur, les reins, les poumons, l'encéphale, etc. (169). L'ADM se fixe à plusieurs récepteurs qui lui sont plus ou moins spécifiques. Ils sont constitués d'une structure moléculaire commune : le *calcitonin receptor-like receptor* (CRLR), et d'une protéine accessoire *receptor-activity modifying protein* (RAMP) qui influe sur la spécificité du récepteur. RAMP1, 2 et 3 ont été décrits. A cause de leur homologie de structure, des composés de la famille des CGRP peuvent aussi se fixer à ces récepteurs. L'association de CRLR à RAMP2 constituerait un récepteur spécifique à l'ADM (170). De part son expression et celle de ses récepteurs dans de nombreux tissus, l'ADM a de multiples effets biologiques. Elle a un effet vasodilatateur au niveau vasculaire (**Figure 18**) ; elle peut induire une augmentation du débit cardiaque sanguin (par dilatation des vaisseaux coronaires et baisse de la post-charge) ; elle a un effet diurétique

et natriurétique (par augmentation du débit sanguin rénal) ; et participe à la régulation de l'homéostasie hydrique en agissant au niveau du système nerveux central. (171).

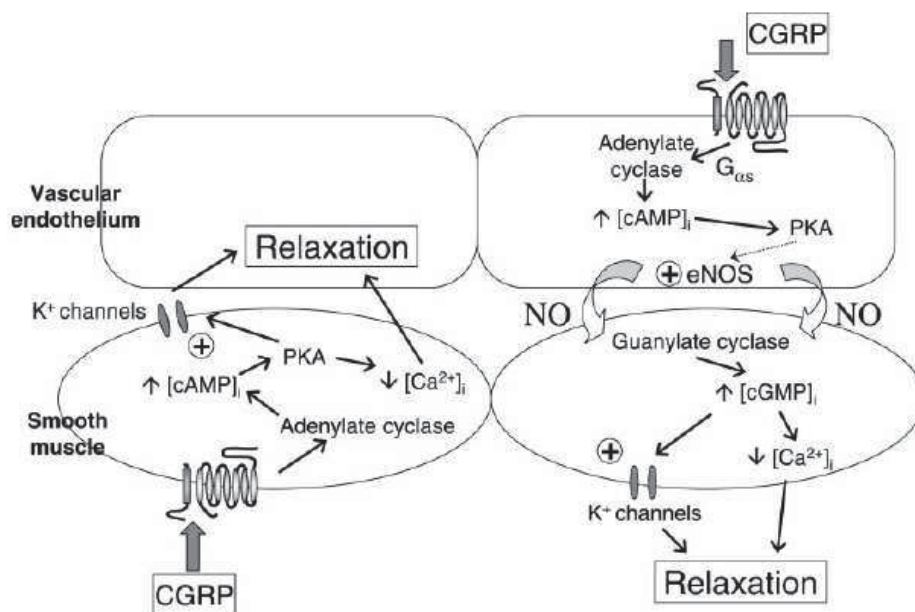


Figure 18 : Représentation schématique des signaux intracellulaires induits par la fixation de l'ADM aux récepteurs du CGRP et conduisant à une relaxation vasculaire (172)

cAMP : cyclic adenosine monophosphate, cGMP : cyclic guanosine monophosphate, PKA : protein kinase A

La demi-vie de l'ADM est courte : environ 22 minutes (171). Les mécanismes de clairance de l'ADM ne sont pas clairement définis. Elle serait éliminée au niveau pulmonaire et différentes enzymes interviendraient dans sa dégradation : métalloprotéases, aminopeptidases ou *neutral endopeptidases* (168, 169).

Lors des états inflammatoires systémiques, et particulièrement lors du choc septique, les concentrations plasmatiques en ADM sont fortement augmentées (173). Différents stimuli peuvent induire la libération d'ADM : notamment le LPS, les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1, le NO ou un état d'hypoxie (169, 171). L'ADM semble jouer un rôle particulier lors du sepsis en intervenant dans l'initiation de la phase hyperdynamique (caractérisée par une augmentation du débit cardiaque et une baisse des résistances vasculaires périphériques) (174), et au niveau immunitaire par sa production par diverses cellules immunitaires (PNN, macrophages), son action sur la production cytokinique ou son effet antimicrobien (175, 176).

5.1.3.2.1.4. Peptide natriurétique auriculaire

Le peptide natriurétique auriculaire (ANP) appartient à la famille des peptides natriurétiques comprenant également le BNP et le *C-natriuretic peptide* (CNP) (177). L'ANP dérive du

préproANP qui est clivé en proANP et stocké principalement dans des granules au niveau des oreillettes cardiaques. Lors de sa sécrétion, le proANP est clivé en ANP mature par une protéase cardiaque trans-membranaire (corin) (178). L'ANP est également présent à plus faible concentration au niveau des ventricules cardiaques et du rein (178). Le stimulus principal déclenchant la libération d'ANP est l'étirement de la paroi auriculaire, résultant d'une augmentation du volume intravasculaire (179). L'ANP, ainsi que le BNP et le CNP, peuvent se lier à trois récepteurs : *natriuretic peptide receptor A* (NPR-A), NPR-B et *natriuretic peptide clearance receptor* (NPR-C). Ils sont exprimés dans différents tissus de l'organisme (178), ce qui explique les multiples fonctions biologiques de ces peptides. L'ANP via le récepteur NPR-A participe à la régulation de la pression artérielle basale (**Figure 19**). Son action hypotensive est médiée par ses effets combinés sur le volume intravasculaire (par augmentation de la perméabilité microvasculaire), la vasorelaxation, la natriurèse et la diurèse (178). L'ANP s'oppose également à l'effet du système rénine-angiotensine-aldostérone en diminuant la concentration plasmatique de ses composantes, et pourrait également entraver la réponse des barorécepteurs (178). L'ANP a aussi des effets sur le cœur (remodelage cardiaque), les poumons (bronchodilatation) ou le système nerveux central (diminution de la soif ou de l'appétence pour le sel) (178).

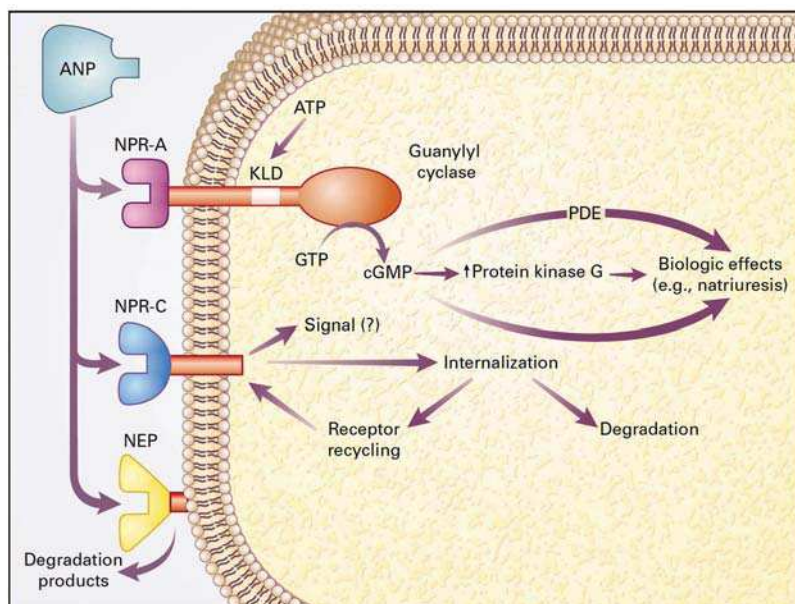


Figure 19 : Représentation schématique des mécanismes intracellulaires induits par la fixation de l'ANP aux récepteurs NPR-A et NPR-C (177)

cGMP : cyclic guanosine monophosphate, GTP : guanosine triphosphate,
KLD : kinase like domain, NEP : neutral endopeptidase, PDE : phosphodiesterases

La demi-vie de l'ANP est très courte : près de 2 minutes (178). Deux mécanismes interviennent dans la dégradation des peptides natriurétiques : l'internalisation et la

dégradation lysosomale via la fixation au récepteur NPR-C (**Figure 19**), et la dégradation par les *neutral endopeptidases* (177).

Chez les patients en sepsis sévère ou en choc septique, la concentration en ANP est augmentée par rapport à des sujets sains (180, 181). En culture, il a été observé que l'ANP ou son précurseur le préproANP pouvaient être induits par l'IL-1 β et des membres de la famille de l'IL-6 (182). L'ANP et ses récepteurs sont exprimés dans diverses cellules immunitaires et pourraient induire des effets immunomodulateurs (183).

5.1.3.2.2. Intérêt analytique des pro-hormones

Les quatre hormones précédemment décrites sont difficilement mesurables dans le sang circulant. Tout d'abord, elles ont une concentration plasmatique physiologique faible, de l'ordre du picomolaire (<10 pmol/l pour ET-1 (152), ADM (168), ANP (178) et AVP (167)). Ensuite, la dégradation des quatre hormones d'intérêt est très rapide, comme en témoigne leur demi-vie de quelques minutes (154, 158, 171, 178). De plus, ET-1 et ADM ont un mode d'action à la fois endocrine et autocrine/paracrine (151, 171), leur site d'action étant à proximité du site de production. Leur passage dans le sang circulant est donc réduit et serait un mauvais indicateur de la quantité d'hormones réellement produite. A cela s'ajoutent des problèmes particuliers tels que la forte fixation de l'AVP aux plaquettes (184) ou l'association de l'ADM à l'*Adrenomedullin-binding protein 1* dans le sang circulant (169), compliquant encore le dosage de ces hormones.

Une alternative à ce dosage a été développée et repose sur la quantification d'un fragment circulant du précurseur de ces hormones. En effet, chacune des quatre hormones dérive d'une prépro-hormone dont différents fragments sont clivés lors de la maturation de l'hormone (152, 158, 169, 178). Les fragments peuvent être détectés dans le sang circulant, libérés du reste de la molécule précurseur (184-187). Les fragments ayant été particulièrement étudiés pour ces hormones sont le fragment *mid-regional* (MR) pour le proANP (188) et le proADM (189), et le fragment *C-terminal* (CT) pour le proET-1 (190) et le proAVP (191) (**Figure 20**). Les critères d'intérêt utilisés pour leur sélection sont la stabilité du fragment (185, 188-191), l'intensité de sa détection (187), son accessibilité pour la fixation des anticorps de détection (188) ou la longueur du fragment (184).

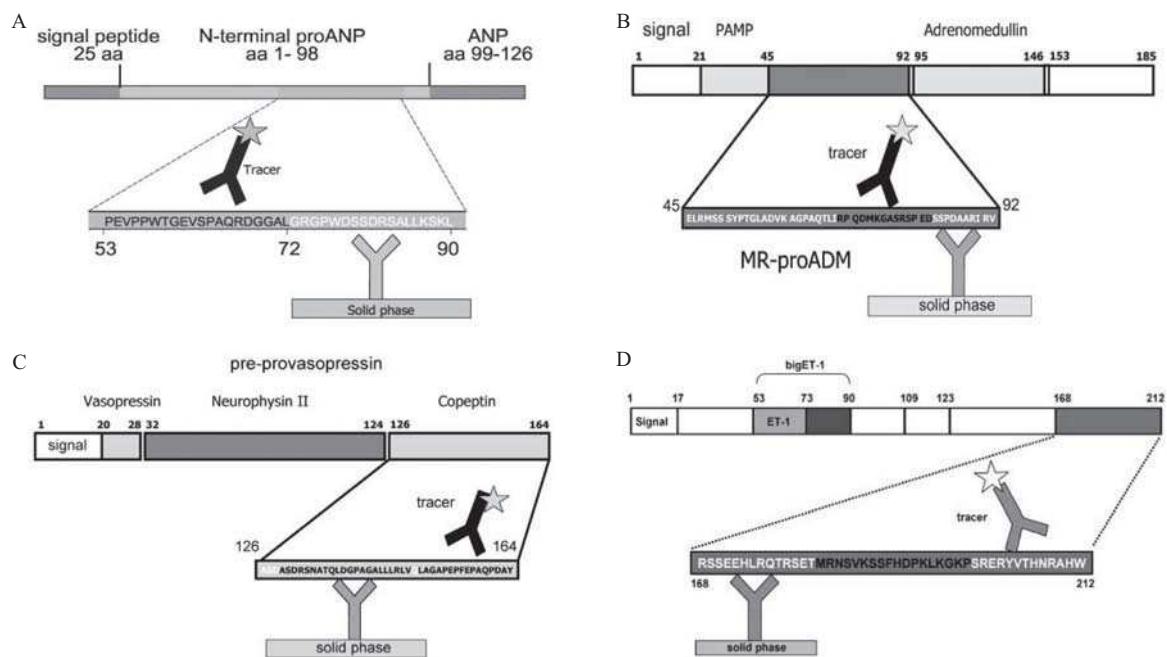


Figure 20 : Quatre précurseurs d'hormones vasoactives : (A) MR-proANP, (B) MR-proADM, (C) CTproAVP, (D) CTproET-1 (188-191)

Bien que la littérature soit controversée (192, 193), il semblerait que les fragments sélectionnés soient dépourvus d'activité biologique dans le compartiment plasmatique (194-197), ce qui pourrait expliquer leur stabilité très supérieure à celle de leurs hormones respectives. Par exemple, pour la CT-proET-1 la stabilité est de 4 heures *ex vivo* à 4°C (<10 % de baisse d'immunoréactivité) (190), de 48 heures pour le MR-proANP (188) et jusqu'à plus de 72 heures pour MR-proADM et CT-proAVP (189, 191). Par commodité, nous avons attribué le terme de « pro-hormone » à ces fragments dans la suite de notre exposé. La concentration plasmatique des pro-hormones est bien supérieure à celle décrite pour les hormones correspondantes, facilitant ainsi leur détection dans le sang circulant. Il a été observé dans plusieurs études que la concentration plasmatique en MR-proADM est de l'ordre du nanomolaire chez les patients septiques (198, 199), et s'élève à plusieurs centaines de picomolaires pour CT-proET-1 (199, 200), CT-proAVP (201, 202) et MR-proANP (203, 204). Ces concentrations importantes pourraient être dues à une forte production de pro-hormones (par réponse adaptative au choc ou par dérégulation et production excessive) ou à une accumulation par défaut d'élimination chez les patients ayant une insuffisance rénale (205). Enfin, les fragments sélectionnés supposés être sécrétés en quantité équimolaire à l'hormone, constitueraient des marqueurs indirects de la production de l'hormone. Par exemple, chez des sujets sains soumis à différentes variations d'osmolalité plasmatique la corrélation entre CT-proAVP et AVP est importante ($r=0,80$) (206). Deux études menées chez des patients septiques ou polytraumatisés ont montré une corrélation significative entre la

concentration en CT-proAVP et en AVP ($r = 0,73$; $p < 0,001$ et $r^2 = 0,72$; $p < 0,001$ respectivement) (207, 208). De même, une corrélation significative a été observée entre CT-proET-1 et ET-1 dans une population de patients septiques ($r = 0,68$; $p < 0,001$) (190).

5.2. Phase anti-inflammatoire

5.2.1. Mécanismes responsables

Pour s'opposer à la réponse pro-inflammatoire excessive caractéristique du sepsis sévère ou du choc septique, une réponse anti-inflammatoire se met en place (209) et fait intervenir plusieurs mécanismes : le système nerveux central avec en particulier l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, la production de médiateurs anti-inflammatoires, des mécanismes de tolérance à l'endotoxine et des processus d'ordre épigénétique ou apoptotique.

5.2.1.1. Régulation centrale

Le système nerveux central (SNC) peut réguler négativement le système immunitaire au niveau systémique, régional et local par différents mécanismes. A l'échelle systémique, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (sous contrôle du SNC) a des effets inhibiteurs sur le système immunitaire via la production de cortisol (**Figure 21**). Trois cytokines (TNF- α , IL-1 et IL-6) fortement produites lors du sepsis ont un rôle synergique important dans l'activation de cet axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. En effet, elles stimulent les neurones hypothalamiques qui synthétisent la *Corticotropin-releasing hormone* (CRH) et la vasopressine, induisant la production hypophysaire d'adrénocorticotrophine (ACTH) qui provoque la synthèse de cortisol par le cortex surrénalien (210). Le cortisol a de multiples conséquences immunomodulatrices médiées par le récepteur aux glucocorticoïdes. Il s'oppose à l'activation des cellules immunitaires (cellules de l'immunité innée et lymphocytes B ou T), à leur migration sur le site de l'inflammation en diminuant l'expression de molécules d'adhésion (ex. : *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*, *Vascular Cellular Adhesion Molecule 1*, *E-selectin*) ou la production de chimiokines, et pourrait induire l'apoptose des leucocytes (113). Il inhibe aussi la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 ou le TNF- α , celle de médiateurs pro-inflammatoires en s'opposant à la synthèse de la phospholipase A2 ou des cyclooxygénases, et il stimule la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-4 ou le TGF- β (113, 211, 212).

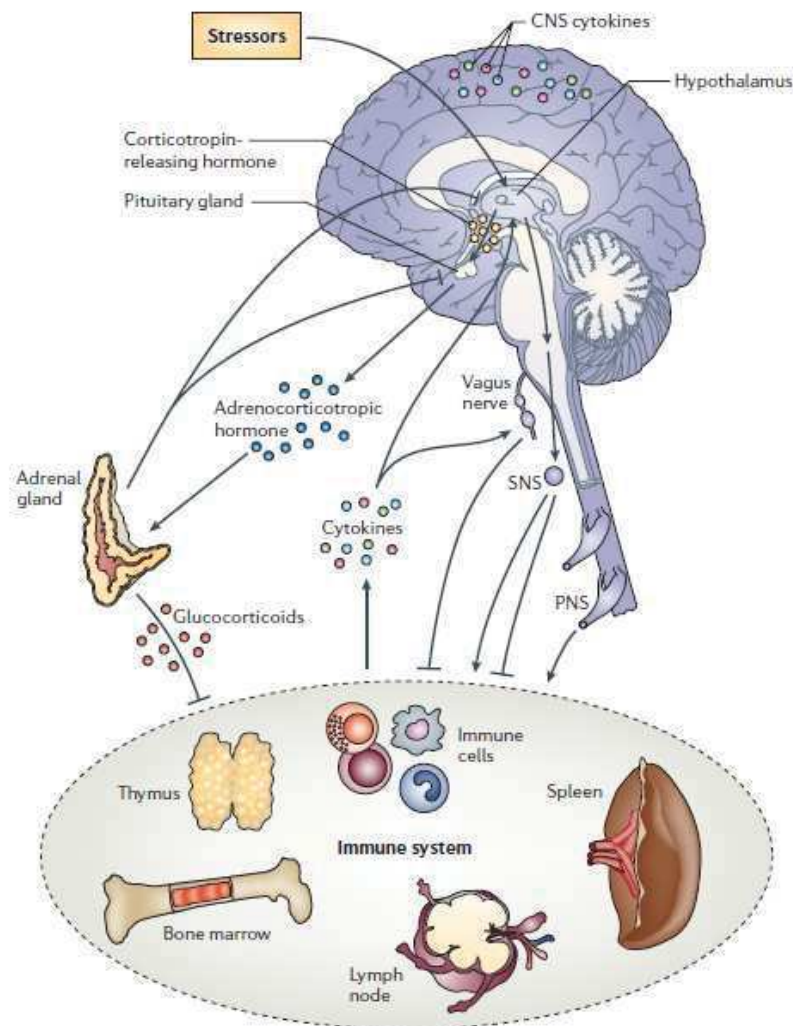


Figure 21 : Connexion schématique entre le système nerveux et le système immunitaire (112)

CNS : central nervous system ; PNS : peripheral nervous system ; SNS : sympathetic nervous system

A l'échelle régionale, via l'innervation des organes lymphoïdes, le système nerveux autonome (SNA, sympathique et parasympathique) a des effets inhibiteurs sur l'immunité (**Figure 21**) (112). Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF- α libérées lors de la réponse à une infection, activent le SNA sympathique, ce qui induit la libération régionale de noradrénaline. *In vitro*, la noradrénaline a des effets immunosuppresseurs sur les monocytes et les cellules dendritiques via sa fixation au récepteur adrénergique β 2 (comme la baisse de la production de cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation de la synthèse d'IL-10). Le neuropeptide Y serait libéré simultanément avec la noradrénaline et aurait également des effets anti-inflammatoires (111, 112, 114). Il est à noter que concernant les lymphocytes, en fonction de leur état d'activation, la noradrénaline peut augmenter ou diminuer leur production d'IFN- γ (111).

Le SNA parasympathique module également le système immunitaire au niveau régional par l'intermédiaire du nerf vague (**Figure 21**). L'IL-1 produite lors d'une infection active les fibres afférentes du nerf vague, ce qui conduit à la libération d'acétylcholine par les fibres

efférentes de ce nerf. L'acétylcholine a des effets anti-inflammatoires médiés particulièrement par les récepteurs nicotiques présents à la surface des macrophages, ce qui se traduit notamment par une baisse de la production de cytokines pro-inflammatoires. Le SNA parasympathique participe donc aussi au rétrocontrôle négatif de la réponse immune (112, 213, 214).

Enfin, localement sur le site de l'inflammation, le système nerveux périphérique peut libérer des neuropeptides aux effets anti-inflammatoires. C'est le cas notamment de l'*α-melanocyte-stimulating hormone* ou du *vasoactive intestinal peptide* qui inhibent la production d'IL-2 ou de TNF- α par les cellules immunitaires (112).

5.2.1.2. Production de médiateurs anti-inflammatoires

En parallèle des molécules pro-inflammatoires produites précocement lors du sepsis, des médiateurs anti-inflammatoires sont également libérés tels que des cytokines anti-inflammatoires (ex. : IL-10 et TGF- β) ou des récepteurs solubles (ex. : récepteur au TNF- α et *IL-1 receptor antagonist* [IL-1 ra]). Ces composés réduisent la production ou empêchent l'action des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- α ou l'IL-12 (215-217) et auraient ainsi un rôle protecteur lors du sepsis. En effet, des souris déficientes en cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) sont très sensibles au choc induit par l'injection de LPS ou de bactéries en raison du développement d'une réaction inflammatoire incontrôlée (218). Ces médiateurs anti-inflammatoires pourraient être induits par les molécules pro-inflammatoires pour empêcher une réaction inflammatoire excessive. Par exemple, la production de l'IL-10 est directement stimulée par les cytokines IL-1 et TNF- α , et les concentrations plasmatiques en TNF- α et en IL-10 sont fortement corrélées chez les patients septiques (219).

Cependant, libérées en grande quantité, ces molécules anti-inflammatoires peuvent également avoir des effets délétères. Une première étude menée chez des enfants atteints de méningococcémie sévère a montré que les concentrations sériques en récepteurs solubles du TNF étaient plus importantes chez les enfants qui décédaient par rapport aux survivants (220). Dans une cohorte de patients en sepsis sévère, les patients non-survivants avaient des concentrations en IL-10 dès l'admission plus importantes que les survivants. De plus, il y avait une baisse de ces concentrations 48 heures après l'admission chez les patients survivants, et un maintien de concentrations élevées chez les non-survivants (221). Les concentrations en IL-10 sont aussi associées à la sévérité de l'atteinte : elles sont plus importantes chez les patients en choc septique par rapport aux patients ayant un sepsis (222),

et sont corrélées positivement avec le score de sévérité *Simplified acute physiology score* (SAPS II) chez des patients en sepsis sévère (221).

Le plasma de patients septiques, contenant de nombreux médiateurs anti-inflammatoires, peut être considéré comme un « milieu immunosuppresseur » (223). En effet, mis en présence de sérum de sujets septiques, la production de TNF- α après incubation *ex vivo* avec une suspension bactérienne est réduite chez le sujet sain de manière concentration-dépendante (224). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle utilisant des monocytes isolés de sujets sains, stimulés par du LPS et mis en présence de sérum de sujets en choc septique (225). Les molécules mises en cause dans cette baisse de production de TNF- α sont notamment l'IL-10 et le TGF- β (225, 226).

Une autre propriété anergisante de l'IL-10 est sa capacité à réduire l'expression des molécules *Human leukocyte antigen* (HLA)-DR à la surface des monocytes en séquestrant ces molécules en intracellulaire (227). Chez les patients en sepsis sévère ou en choc septique, les concentrations plasmatiques en IL-10 sont ainsi inversement corrélées avec l'expression monocyttaire de HLA-DR (HLA-DRm) (228, 229). Par ce mécanisme, l'IL-10 réduit la capacité des monocytes à activer les lymphocytes et nuit au fonctionnement des défenses immunitaires. En effet, chez des patients polytraumatisés, il a été observé qu'une augmentation des concentrations en IL-10 dans le LBA était corrélée à une baisse d'expression de HLA-DR par les macrophages alvéolaires et précédait le développement d'infections nosocomiales chez ces patients (230).

D'autres médiateurs anti-inflammatoires sont produits au cours du sepsis comme des prostaglandines (ex. : prostaglandine E2 [PGE2]) (231), le cortisol ou des neuromédiateurs. La libération dans la circulation sanguine de l'ensemble de ces médiateurs contribue à créer un état d'anergie et de désactivation cellulaire touchant la majorité des populations cellulaires immunes du sang circulant.

5.2.1.3. Tolérance à l'endotoxine

La tolérance à l'endotoxine est décrite comme la situation au cours de laquelle une première exposition à une faible dose de LPS induit une période transitoire d'incapacité de l'organisme à répondre à une seconde exposition au LPS (232). Ainsi, des souris ayant reçu une dose sublétales de LPS sont protégées d'une seconde dose létale de LPS. Ce phénomène de tolérance à l'endotoxine a aussi été reproduit chez l'homme par injection d'une dose de LPS à des volontaires sains suivie *in vitro* ou *in vivo* par une autre exposition à du LPS. Les

capacités de production de molécules pro-inflammatoires telles que le TNF- α sont réduites lors de cette seconde exposition (233, 234).

Les patients septiques présentent des caractéristiques similaires au phénomène de tolérance à l'endotoxine. En effet, une réponse altérée au LPS des monocytes circulants a été observée chez les patients septiques. Après stimulation avec du LPS, les monocytes de patients septiques ou en SIRS sont caractérisés par une réduction significative de la production *ex vivo* d'IL-1 α , d'IL-1 β , de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-12 (235-237) avec en parallèle une forte libération de cytokines anti-inflammatoires (238). Ainsi, les cellules ne sont pas complètement anergisées mais seraient plutôt reprogrammées en faveur d'un profil de réponse anti-inflammatoire. Cette reprogrammation peut persister car contrairement aux patients survivants, Munoz *et al.* ont observé que les patients non-survivants ne recouvraient pas une réactivité normale jusqu'à leur décès (235).

Les mécanismes responsables de la tolérance à l'endotoxine sont complexes et incomplètement élucidés (238). Tout d'abord, la production exagérée de cytokines anti-inflammatoires, notamment d'IL-10, joue probablement un rôle important dans le développement des altérations fonctionnelles des monocytes (232). Sfeir *et al.* ont montré que l'IL-10 plasmatique était en partie responsable de la diminution de la réponse au LPS des monocytes de patients septiques (225). Chez 16 patients non septiques subissant une opération de gastrectomie partielle, Ogata *et al.* ont observé au cours de l'opération une augmentation des concentrations circulantes d'IL-10 et de cortisol parallèlement à une diminution de la capacité des cellules à produire du TNF- α en réponse au LPS. L'IL-10 jouerait un rôle dans cet état de tolérance à l'endotoxine car l'addition d'anticorps bloquants anti-IL-10 induisait une restauration de la capacité des cellules à produire du TNF- α (239).

Parallèlement, la diminution des récepteurs de surface impliqués dans la réponse au LPS pourrait également expliquer en partie la tolérance aux produits microbiens (240). Ainsi, une diminution de l'expression de CD14 a été observée chez les patients en choc septique ou après un traumatisme (241-243). De façon contradictoire, certaines études mettent en avant une diminution de l'expression de TLR4 au cours du sepsis (238, 240), tandis que d'autres observent une augmentation de son expression (244, 245).

Une modification des mécanismes intracellulaires de la réponse générée par les produits microbiens est aussi présente au cours du phénomène de tolérance à l'endotoxine (232). C'est le cas de la voie du NF- κ B, principal facteur de transcription requis dans la transcription des

gènes codant pour des molécules inflammatoires comme le TNF- α . Ce médiateur intracellulaire existe sous une forme hétérodimère active p65p50 et une forme inactive homodimère p50p50. Une diminution significative du ratio p65p50/p50p50 a été démontrée dans des expériences menées *in vitro* sur des monocytes de patients septiques stimulés par du LPS (246). Ce ratio était encore plus faible chez les patients non-survivants (246).

Plusieurs médiateurs ont aussi été impliqués dans l'altération des étapes initiales de la transduction du signal d'activation des TLR (**Figure 22**): IRAK-M (*IL-1 receptor associated kinase-M*) par exemple empêche la dissociation de IRAK-1 et IRAK-4 avec le MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) et la formation de TRAF6 (*TNF-IRAK receptor associated factor 6*) (216). D'autres molécules intracellulaires comme Tollip (*Toll interacting protein*), *MyD88 short* (un variant de MyD88) ou SOCS-1 (*Suppressor of cytokine signaling-1*) ont aussi été impliquées (232, 238). Ainsi, l'augmentation de ces régulateurs négatifs de la voie de NF- κ B dans les monocytes de patients septiques contribue probablement à l'altération de la réponse pro-inflammatoire au LPS et aux autres dérivés microbiens (85, 232, 238).

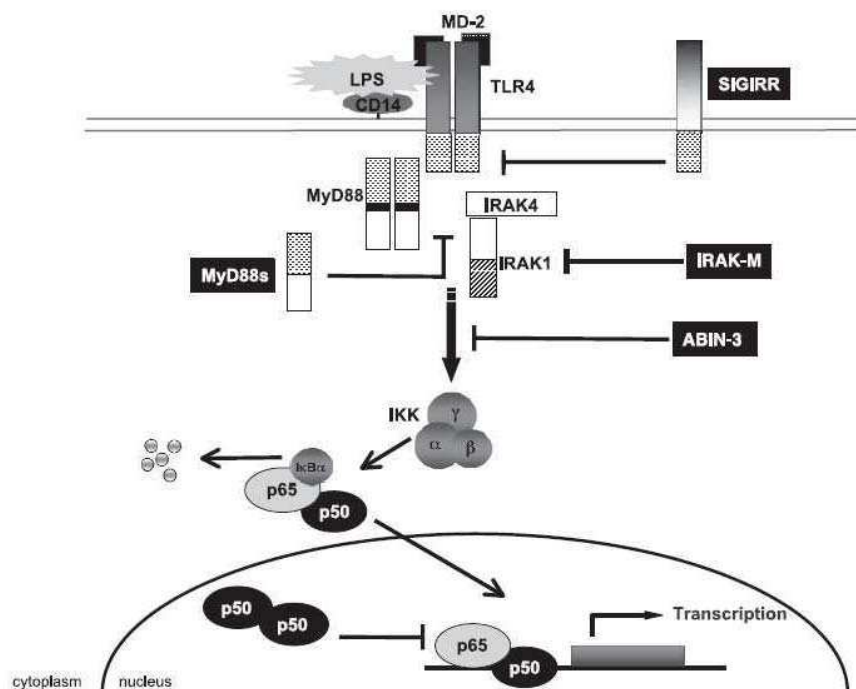


Figure 22 : Exemples de médiateurs impliqués dans l'altération de l'activation du NF- κ B (216)

ABIN-3 : A20-binding inhibitor of NF-kappa-B activation-3, IRAK-M : Interleukin (IL)-1 receptor associated kinase-M, MyD88(s) : myeloid differentiation factor 88 (soluble), SIGIRR : single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule

Il est à noter que l'état de « reprogrammation » cellulaire en faveur d'un profil de réponse anti-inflammatoire semble persister longtemps après l'épisode septique, ce qui serait en faveur de modifications d'ordre épigénétique (247).

5.2.1.4. Epigénétique

L'épigénétique est un terme général regroupant tous les mécanismes qui gouvernent l'expression des gènes sans modifier la séquence ADN existante de l'organisme (248). Ces mécanismes sont réversibles et sont contrôlés par des processus complexes impliquant au niveau transcriptionnel des modifications chimiques des histones et/ou de l'ADN, et au niveau post-transcriptionnel la mise en jeu d'ARN interférents dits « silencieux » (249). Brièvement, concernant les mécanismes chimiques, l'acétylation des histones (par les histones acétylases) induit une conformation « ouverte », plus relâchée de la chromatine, ce qui favorise la transcription génique (en facilitant l'accessibilité aux facteurs de transcription ou aux polymérase). Au contraire la déacétylation des histones (par les histones deacétylases) conduit à une conformation plus condensée de la chromatine entravant la transcription. De même, la méthylation des histones sur des lysines particulières favorise une conformation relâchée ou condensée de la chromatine. L'ADN peut aussi être méthylé, ce qui se traduit par une répression de l'expression génique. Les processus de modification des histones et de méthylation de l'ADN seraient coordonnés, et aboutissent donc par un changement de structure du matériel génétique, à une forme transcriptionnellement active ou réprimée des gènes (248-250). Pour ce qui est des ARN interférents, ce sont au départ des ARN double brins (présents dans la cellule) qui sont clivés en petites séquences ARN (20-30 nucléotides) par une ribonucléase (Dicer). Après séparation des deux brins, un des brins d'ARN est transféré au complexe protéique *RNA-induced silencing complex* (RISC). Lorsque l'ARN interférent fixe un ARNm qui lui est complémentaire, cet ARNm est alors dégradé par le complexe RISC, empêchant ainsi sa traduction protéique (251, 252). Les ARN interférents régulent donc négativement l'expression de gènes cibles au niveau post-transcriptionnel.

Les mécanismes épigénétiques précédents interviendraient dans la physiopathologie septique. En effet, la réponse anti-inflammatoire qui se développe au cours du sepsis ne serait pas seulement due à une augmentation de la production de médiateurs anti-inflammatoires, mais comprendrait également une suppression dynamique directe de la production des médiateurs pro-inflammatoires par ces mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression des gènes (248). Il a récemment été décrit dans un modèle de tolérance à l'endotoxine utilisant des macrophages stimulés à deux reprises avec du LPS, que certains gènes de ces cellules avaient une expression réduite voire nulle lors de la seconde stimulation (gènes dit tolérants), et d'autres gènes avaient une expression identique voire augmentée la seconde fois (gènes dit non tolérants) (253). Globalement dans cette étude, les gènes tolérants correspondaient à des gènes codant des molécules pro-inflammatoires, alors que les gènes non-tolérants codaient

pour des molécules antimicrobiennes (253). Un élément pour expliquer ces différences de régulation est que seules les histones des promoteurs des gènes non-tolérants étaient réacétylées lors de la seconde stimulation au LPS. Au contraire les histones des promoteurs des gènes tolérants étaient sélectivement déacétylées (253). De plus, dans les macrophages rendus tolérants, l'ARN polymérase II n'était recrutée qu'au niveau des promoteurs des gènes non-tolérants ; alors que dans les macrophages naïfs après la première stimulation par le LPS, elle était recrutée au niveau des deux classes de gènes (tolérants et non-tolérants) (253). Ainsi un signal identique (induit par l'activation du TLR4) pourrait provoquer une régulation différente au niveau de gènes spécifiques. Des résultats assez similaires ont été observés dans un modèle de tolérance à l'endotoxine utilisant des monocytes de sujets sains (254). Dans cette étude, les gènes tolérants comprenaient ceux codant pour le TNF- α , l'IL-6, l'IL-12, l'IFN- γ ou des molécules régulant la présentation antigénique ; et les gènes non-tolérants regroupaient des gènes codant pour des facteurs bloquant la signalisation pro-inflammatoire comme IRAK-M, pour des molécules antimicrobiennes ou favorisant l'activité de phagocytose (254). De plus, le processus de reprogrammation génique semble être dynamique puisqu'en fonction du délai entre les deux stimulations au LPS, certains gènes étaient tolérants de manière précoce mais transitoire alors que d'autres n'étaient tolérants que tardivement. Au final, l'association d'une activité pro-inflammatoire réduite et d'une capacité phagocytaire et anti-microbienne accrue pourrait permettre de favoriser la clairance bactérienne tout en empêchant le développement d'une réponse inflammatoire excessive conduisant au choc septique (254).

Un autre élément important dans la physiopathologie septique qui ferait intervenir les processus de régulation épigénétique est la persistance d'une réponse à prédominance anti-inflammatoire au cours du temps après l'épisode septique. Une hypothèse récemment émise est que les leucocytes périphériques garderaient une « empreinte » de cette régulation épigénétique et que cette « empreinte » pourrait aussi être induite dans les cellules progénitrices de la moëlle, perpétuant ainsi le déséquilibre de la réponse immune en faveur d'une réponse anti-inflammatoire dans les cellules filles (248). Cette hypothèse reste à confirmer et d'une manière générale, l'amélioration de la compréhension des processus épigénétiques dans la régulation des mécanismes de tolérance à l'endotoxine au cours du sepsis doit être poursuivie.

5.2.1.5. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est un processus de suicide cellulaire actif, extrêmement régulé et dépendant de la production d'énergie (à la différence de la nécrose). L'apoptose n'induit pas de réaction inflammatoire car au cours de ce mécanisme, l'intégrité de la membrane cellulaire est maintenue, empêchant la libération des composés intracellulaires dans le milieu extracellulaire, et les corps apoptotiques formés sont rapidement phagocytés (255).

L'apoptose peut être induite par deux voies principales différentes et convergentes (**Figure 23**) : la voie extrinsèque qui fait intervenir des récepteurs membranaires de mort cellulaire, et la voie intrinsèque via les mitochondries (255). Concernant la voie extrinsèque, les récepteurs de mort cellulaire comprennent notamment les récepteurs du $TNF-\alpha$, de Fas ou de *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Après fixation de leurs ligands respectifs, les récepteurs de mort cellulaire s'activent et recrutent une protéine adaptatrice : *Fas associated death domain* (FADD). FADD interagit alors avec les récepteurs de mort cellulaire et la procaspase-8 pour former le complexe *Death Inducing signalling complex* (DISC), ce qui aboutit au clivage et à l'activation de la caspase-8 qui active elle-même d'autres caspases effectrices telles que la caspase-3 (256, 257).

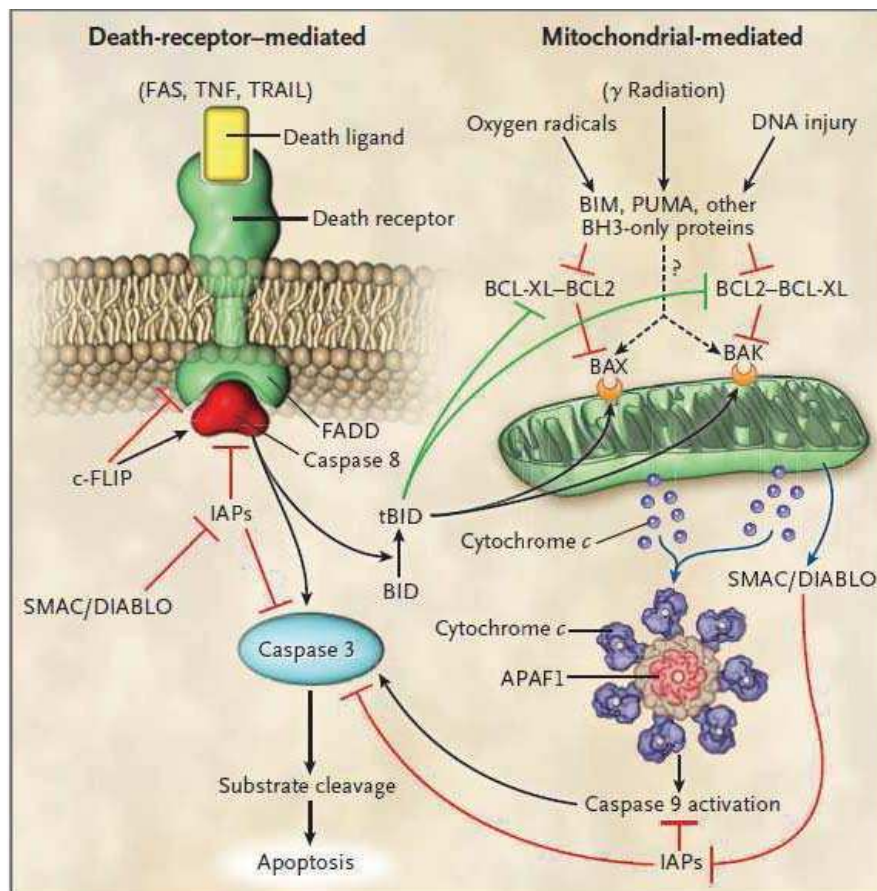


Figure 23 : La voie extrinsèque et la voie intrinsèque de l'apoptose (255)

APAF1 : Apoptotic peptidase activating factor 1, cFLIP : cellular FLICE-inhibitory protein, FADD : Fas associated death domain, IAP : inhibitors of apoptosis protein, tBID : truncated form of BID, TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

La voie intrinsèque est initiée par différents signaux de dommages cellulaires importants : l'augmentation intracellulaire des dérivés actifs de l'oxygène, l'altération de l'ADN, l'accumulation de protéines avec une conformation anormale dans le réticulum endoplasmique, ou le manque de facteurs de croissance (ex. : IL-2 ou *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* [GM-CSF]) (255, 257, 258). Cela conduit à une augmentation de la perméabilité mitochondriale et permet le passage de molécules pro-apoptotiques depuis l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytosol (ex. : cytochrome c), ou de protéines comme SMAC/DIABLO qui antagonisent les molécules anti-apoptotiques présentes dans le cytosol (**Figure 23**). Le cytochrome c libéré et la protéine adaptatrice Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) sont nécessaires à l'activation de la procaspase-9 en caspase-9, qui conduit à l'activation d'autres caspases dont la caspase-3 (255, 259).

Les caspases sont des molécules centrales de l'apoptose car elles facilitent la destruction de la cellule en agissant sur certaines cibles : elles activent une enzyme dégradant l'ADN, elles clivent sélectivement différentes protéines du cytosquelette, de la membrane nucléaire ou responsables de l'attachement de la cellule à ses voisines. Les cellules apoptotiques ainsi détachées seront rapidement ingérées par les cellules phagocytaires (258, 259).

Les mécanismes apoptotiques sont étroitement contrôlés au niveau cellulaire. Les protéines de la famille BCL-2 interviennent dans ce contrôle : elles comprennent des molécules anti-apoptotiques telles que BCL-2 ou BCL-XL et des molécules pro-apoptotiques telles que BAK, BAX, BID, BIM ou PUMA (255, 258, 260).

Au cours du choc septique, les cellules immunitaires les plus touchées par les mécanismes apoptotiques sont les lymphocytes (116, 261) et les cellules dendritiques (**Figure 24**) (262-264). Les mécanismes induisant leur apoptose sont partiellement connus : ils semblent faire intervenir notamment les glucocorticoïdes, les cytokines telles que TNF- α , IL-1 ou IL-6, les dérivés actifs de l'oxygène ou le NO (molécules fortement produites lors de la physiopathologie septique), les lymphocytes T cytotoxiques qui expriment Fas-L à leur surface ou un déficit de protéine anti-apoptotique BCL-2 (257, 265, 266).

L'apoptose induite a comme double effet de réduire le nombre de lymphocytes et de cellules dendritiques fonctionnels et d'induire un effet immunosuppresseur via les cellules apoptotiques produites (**Figure 24**). En effet, il a été observé que des monocytes stimulés par du LPS et mis en présence de lymphocytes apoptotiques produisaient plus d'IL-10 et moins de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 ou IL-12) (267). De plus, l'injection *in vivo* de cellules apoptotiques à des souris septiques 5 jours avant la ligature et ponction caecales

(CLP) réduit la survie des souris par rapport à celles n'ayant subi que la CLP, ou ayant reçu des cellules nécrotiques avant la CLP (268). L'effet délétère des cellules apoptotiques semble s'expliquer par l'aggravation de la baisse de production d'IFN- γ (déjà induite par le sepsis) (268).

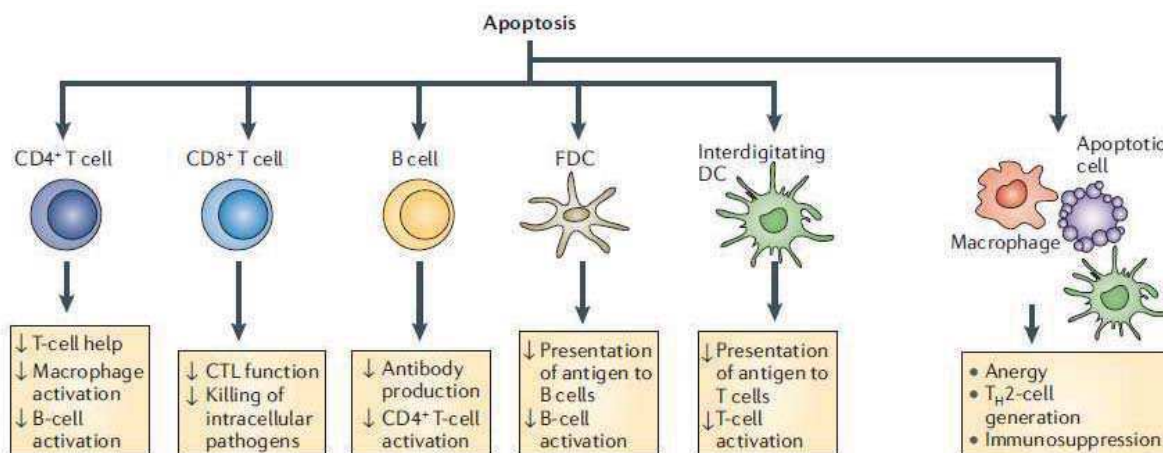


Figure 24 : Effet de l'apoptose sur les différentes populations leucocytaires (269)

FDC : follicular dendritic cell

En conclusion, de nombreux mécanismes anti-inflammatoires se mettent en place lors du sepsis au niveau central, périphérique et cellulaire pour rétablir l'homéostasie de la réponse immune et s'opposer aux effets délétères de la réponse pro-inflammatoire excessive. Cependant une réponse anti-inflammatoire exagérée peut conduire à une défaillance du système immunitaire et réduire les capacités de défense de l'organisme aux infections (43).

5.2.2. Dysfonction du système immunitaire lors du choc septique

Les mécanismes anti-inflammatoires qui se développent au cours du sepsis ont des conséquences sur les différentes lignées de l'immunité cellulaire. Compte tenu du peu de données disponibles sur les polynucléaires neutrophiles, et de la nature de notre travail personnel, nous focaliserons cette partie sur les altérations qui touchent particulièrement les monocytes et les lymphocytes. Des données plus récentes sur les cellules dendritiques seront envisagées dans la discussion générale de ce manuscrit.

5.2.2.1. Dysfonction monocytaire

Les monocytes sont des cellules importantes dans la mise en place de la réponse immunitaire : elles sont à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative de part leur capacité à

produire diverses cytokines, à phagocyter et détruire des microorganismes et à présenter des antigènes aux cellules lymphocytaires. Lors du sepsis, les monocytes présentent différentes altérations fonctionnelles.

5.2.2.1.1. Production cytokinique

Après stimulation par des composés bactériens, les monocytes ont une capacité réduite à produire des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 α , l'IL-6 ou l'IL-12, alors que leur libération de médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 ou l'*interleukin-1 receptor antagonist* n'est pas affectée, voire même est légèrement augmentée (231, 235, 237). Un des mécanismes intracellulaires pouvant expliquer la baisse de production des molécules pro-inflammatoires est la production accrue d'inhibiteurs de la voie du facteur de transcription NF- κ B (216). Au contraire, l'activation de la voie du *p38 mitogen activated protein kinase* pourrait expliquer l'augmentation de la production de l'IL-10 (42).

5.2.2.1.2. Recrutement cellulaire et réponse défensive contre le pathogène

Une molécule importante dans la capacité de migration des monocytes est le récepteur *Chemokine (C-X3-C motif) Receptor 1* (CX3CR1) exprimé à leur surface. CX3CR1 est le récepteur de la fractalkine : chimiokine transmembranaire exprimée à la surface des cellules endothéliales (270). Les études menées chez l'homme comme chez la souris ont montré que CX3CR1 contribuait fortement à la migration des monocytes ainsi qu'à l'activation et à la réponse défensive contre le pathogène (271, 272). En effet, son expression préférentielle au niveau des cellules Th1 pro-inflammatoires ainsi que l'interaction avec son ligand (fractalkine ou CX3CL1) semblent constituer un processus d'amplification de cette réponse Th1 (273). Récemment, Pachot *et al.* ont démontré une diminution significative de l'expression de CX3CR1 (au niveau protéique et ARNm) chez des patients en choc septique comparés aux sujets sains. De plus, cette diminution persistait chez les non-survivants par rapport aux survivants jusqu'à 10 jours après le choc (274). Vu l'importance de l'interaction fractalkine/CX3CR1 dans les processus de recrutement monocytaire lors d'une lésion endothéliale ou d'une infection (275), cette perte d'expression de CX3CR1 pourrait être en lien avec l'incapacité des patients non-survivants à recouvrer une réponse pro-inflammatoire adaptée et à pouvoir éliminer l'agent pathogène.

Les effets délétères du choc septique ne sont pas limités aux seuls pools de monocytes circulants. En effet, les macrophages alvéolaires présentent aussi des altérations de leurs fonctions immunes. Cela a été mis en évidence dans un modèle murin de CLP où les macrophages alvéolaires présentaient une capacité réduite à ingérer des bactéries *Escherichia*

coli marquées 24 heures après l'induction du choc, et jusqu'à 48 heures après, par rapport à des souris non septiques (276). Dans un modèle de CLP, il a été observé *ex vivo* que les macrophages alvéolaires perdaient à la fois leur capacité de phagocytose et de destruction de bactéries *Pseudomonas aeruginosa* par rapport à des souris non septiques, ce qui se traduisait *in vivo* par une clairance bactérienne réduite et une mortalité accrue (277).

5.2.2.1.3. Présentation antigénique et expression de HLA-DR monocytaire

Une propriété majeure des monocytes est leur capacité de présentation des antigènes aux lymphocytes T. Dans un modèle de stimulation de monocytes de sujets sains avec une faible dose de LPS suivie d'une incubation sur plusieurs jours en présence de lymphocytes T autologues et d'antigènes de rappel (tels que la toxine tétanique, la candidine ou la tuberculine), il a été observé une diminution de la prolifération lymphocytaire ainsi que de la production d'IFN- γ . Cette capacité réduite des monocytes à induire une stimulation lymphocytaire a été associée à une baisse d'expression des molécules HLA-DR (nécessaire à la présentation antigénique), des molécules de co-stimulation (CD86) et des molécules d'adhésion (CD58 ou *leukocyte function-associated antigen-3*) à leur surface (278). Ces résultats ont été confirmés en clinique : les monocytes de patients septiques perdent leur capacité à induire la prolifération lymphocytaire *ex vivo* en réponse à la toxine tétanique, ce qui est associé à une expression monocyttaire réduite en molécules HLA-DR et CD86 (279).

L'expression des molécules HLA-DR à la surface des monocytes (HLA-DRm) a été corrélée aux différentes altérations présentées ci-dessus (237, 280). Ainsi l'expression de HLA-DRm est considérée comme un « gold-standard » dans les études cliniques pour évaluer la dysfonction monocyttaire. Nous allons détailler dans ce qui suit les mécanismes intervenant dans l'expression de HLA-DRm, les causes et les conséquences de la baisse de son expression monocyttaire, la restauration possible de son expression et les conséquences cliniques de la baisse de son expression.

Les molécules HLA-DR appartiennent aux molécules de classe II du Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui comprennent également les isotypes HLA-DQ et HLA-DP. Contrairement à l'expression ubiquitaire des molécules du CMH de classe I, celle du CMH de classe II se limite principalement aux cellules présentatrices d'antigènes (ex. : monocyte, macrophage, cellule dendritique ou lymphocyte B). Elles sont constituées de glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques (chaîne α et β). Après leur synthèse, ces complexes protéiques sont transportés, en association avec la chaîne invariante Ii jouant le rôle de protéine chaperone, dans des vésicules intracellulaires où ils recevront et fixeront des peptides

dérivant du processus d'internalisation et de clivage de composés exogènes. Les molécules HLA-DMA et HLA-DMB ont un rôle important dans cette étape de fixation. Les complexes peptides antigéniques-CMH de classe II sont ensuite transportés à la surface des monocytes où ils pourront interagir avec le *T-cell receptor* (TCR) des lymphocytes T CD4⁺ et ainsi induire leur activation (281-283).

Un composé important dans la production des molécules HLA-DR et leur transport jusqu'à la surface de la cellule est l'activateur de transcription CIITA (*MHC class II transactivator*). Il coordonne notamment l'expression de la chaîne invariante, de HLA-DMA et HLA-DMB, composés clés dans les processus aboutissant à la présentation de l'antigène (281-283).

La baisse d'expression des molécules HLA-DR monocytaires a été observée dans différents états traumatiques (grands brûlés (284), polytraumatisés (285), chirurgie invasive (286), transplantation d'organe (287), pancréatite aiguë (288) ou accident vasculaire cérébral (289)) et lors des états septiques sévères (228, 229, 290).

Cette baisse d'expression de HLA-DR à la surface des monocytes semble s'expliquer par plusieurs mécanismes. Tout d'abord au niveau transcriptionnel, il a été montré chez les patients en choc septique une baisse de l'expression ARNm des chaînes α et β (constituant la molécule HLA-DR), de la chaîne invariante Ii, de HLA-DM et de CIITA (291). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus à partir de monocytes de sujets sains après incubation *in vitro* avec du LPS (292).

De plus, des mécanismes post-traductionnels ont été décrits comme la capacité de l'IL-10 à séquestrer les molécules HLA-DR nouvellement produites dans des vésicules intracellulaires et à s'opposer au retour à la surface de la membrane plasmique des molécules HLA-DR déjà produites et internalisées (227, 293).

Il a également été proposé que la baisse d'expression de HLA-DR monocyttaire résulte d'une diminution plus globale de la synthèse protéique des leucocytes lors du sepsis sévère, qui serait due à un défaut de production énergétique des mitochondries (notamment par découplage de la chaîne respiratoire) ou à une expression réduite du complexe ARN polymérase II ou des protéines ribosomales nécessaires à toute synthèse (294-296).

Enfin, différents composés produits lors du sepsis sévère semblent agir sur l'expression de HLA-DR monocyttaire (par inhibition ou induction) tels que les corticoïdes (297, 298), les catécholamines (299) et différentes cytokines (TNF- α , IL-1, IFN- γ : effet inducteur, IL-10, TGF- β , PGE2 : effet inhibiteur) (280, 300). L'expression de HLA-DR monocyttaire serait la

résultante de ces différents processus d'activation et d'inhibition et reflèterait ainsi l'état de fonctionnement des cellules monocytaires.

Au niveau de la réponse immunitaire, il a été montré *in vitro* que la baisse d'expression monocyttaire de HLA-DR a pour conséquence de réduire la capacité des monocytes à induire l'activation des lymphocytes T (par mesure du flux calcique induit), leur prolifération ou leur production d'IFN- γ en réponse à des antigènes de rappel (toxine tétanique, tuberculine ou candidine) (278, 279, 301). De plus, la baisse d'expression des molécules HLA-DR est aussi associée à une réponse réduite des monocytes à une stimulation par du LPS, de l'Entérotoxine B staphylococcique ou du *Phorbol myristate acetate* (PMA), se traduisant par une diminution de la production en TNF- α et/ou en IL-1 β (231). Dans un autre modèle, il a été montré *in vitro* une baisse de production de TNF- α et d'IL-8 par une lignée cellulaire de type monocyttaire ayant une faible expression de molécules de CMH de classe II, et dont la production cytokinique et l'expression moléculaire étaient rétablies après la transfection de CIITA dans ces cellules (302).

Différentes molécules ont été évaluées pour leur capacité à restaurer l'expression monocyttaire de HLA-DR. *In vitro*, le GM-CSF ou l'INF- γ augmentent l'expression monocyttaire de HLA-DR de patients polytraumatisés ou septiques (respectivement) (303, 304). Ces molécules augmentent aussi la production monocyttaire de TNF- α en réponse au LPS chez ces mêmes patients (303, 304). *In vivo*, l'administration de ces molécules donnent des résultats similaires avec normalisation rapide de l'expression monocyttaire de HLA-DR chez ces patients et *ex vivo* avec l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à du LPS (304-306).

Du point de vue clinique, la baisse d'expression de HLA-DR monocyttaire se traduit par un risque plus important de développer une infection nosocomiale ou de décéder. Cela a été montré dans des populations de patients en choc septique (298, 307-310) ou en sepsis sévère (229), des grands brûlés (284), des patients poly-traumas (230, 285), ayant subi une chirurgie invasive (286, 311), une transplantation d'organe (287, 312), ou des patients ayant une pancréatite aiguë (288, 313).

5.2.2.2. Dysfonction lymphocytaire

5.2.2.2.1. Apoptose et lymphopénie

Les patients en choc septique présentent une lymphopénie qui touche notamment les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ circulants et qui persiste pendant la première semaine après le choc (314, 315). Cette lymphopénie peut s'expliquer par un fort recrutement des lymphocytes au niveau des foyers infectieux et surtout par une apoptose très importante des lymphocytes (316).

Chez les patients septiques, sur des analyses réalisées rapidement après leur décès, il a été observé qu'ils présentaient une apoptose marquée au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques (116) ainsi qu'une forte baisse des lymphocytes B et T CD4⁺ (261). Au niveau du sang circulant, plusieurs études ont montré une apoptose accrue des lymphocytes chez les patients en sepsis sévère ou en choc septique par rapport à des sujets sains (316-319). Cette apoptose serait médiée à la fois par la voie extrinsèque et la voie intrinsèque puisqu'il a été observé au niveau lymphocytaire une augmentation des formes actives des caspases-3, -9 et -8 chez les patients en choc septique par rapport à des sujets sains (316).

Au niveau clinique, il a été montré qu'une lymphopénie persistant au moins 3 jours était associée à un risque accru de développer une infection nosocomiale chez les patients de réanimation adultes et enfants (après ajustement sur les données cliniques) (320, 321). De plus, une lymphopénie présente pendant plus d'une semaine serait associée à un risque accru de mortalité chez ces enfants (321).

L'importance de l'apoptose lymphocytaire dans la physiopathologie du choc septique est également observée dans les modèles expérimentaux. Il a été montré que des monocytes purifiés, stimulés par du LPS et mis en présence de lymphocytes apoptotiques, produisaient plus d'IL-10 et moins de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-12 que lorsqu'ils étaient mis en culture avec des lymphocytes non apoptotiques (267).

Dans des modèles animaux *in vivo*, il a été montré que les propriétés anti-inflammatoires des cellules apoptotiques réduisaient la survie des souris ayant subi une CLP (lorsque ces cellules leur étaient transférées 5 jours avant l'induction du choc) (268). Au contraire, les thérapeutiques visant à réduire l'apoptose lymphocytaire ont des conséquences bénéfiques sur la survie des souris. En effet, des inhibiteurs de caspases administrés après induction du choc septique permettent de réduire l'apoptose lymphocytaire, de favoriser l'élimination

bactérienne et d'améliorer la survie des souris septiques (322, 323). L'induction d'une sur-expression de BCL-2 a les mêmes effets bénéfiques (323, 324).

L'apoptose induite par le choc septique a donc comme double effet de réduire le nombre de lymphocytes effecteurs et d'induire un effet immunosuppresseur via les cellules apoptotiques produites. Les molécules s'opposant à l'apoptose lymphocytaire pourraient constituer des composés intéressants chez les patients en choc septique. Cependant, il reste à résoudre certains problèmes tels que le ciblage des lymphocytes par ces molécules (le blocage de l'apoptose des neutrophiles pouvant être délétère lors du choc septique), le blocage ou l'induction de composés clés dans la cascade apoptotique, ou le blocage partiel et transitoire des caspases (puisque'elles seraient nécessaires à la mise en place d'une réponse immune effective) (266, 269, 325, 326).

5.2.2.2.2. Diminution des fonctions prolifératives lymphocytaires

Heidecke *et al.* ont évalué les capacités de prolifération lymphocytaire dans une cohorte de 32 patients septiques en post-chirurgie. Pour mimer le processus d'activation physiologique des lymphocytes T et pour s'affranchir du défaut de présentation antigénique des monocytes, la prolifération lymphocytaire a été induite par l'emploi d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Ils ont observé que les patients qui décédaient avaient une prolifération lymphocytaire plus faible que celle des patients survivants. En parallèle, une diminution de la production d'IL-2 lymphocytaire était présente chez les patients non-survivants dès le début du sepsis, alors que ces concentrations étaient identiques entre les patients survivants et les sujets sains (327). De manière similaire, Roth *et al.* ont observé une prolifération lymphocytaire réduite en réponse à des anticorps anti-CD3 ou à un mitogène (phytohéماغglutinine [PHA]) chez 15 patients septiques par rapport à des sujets sains (328). Cela est aussi décrit chez des patients présentant d'autres formes d'affections graves (traumatismes et brûlures sévères) (329).

5.2.2.2.3. Lymphocytes T régulateurs

L'augmentation du pourcentage des cellules aux propriétés régulatrices est une des caractéristiques de l'altération des sous-populations lymphocytaires chez les patients septiques. Monneret *et al.* ont été les premiers à démontrer cette augmentation des lymphocytes CD4⁺CD25⁺ dans le choc septique en 2003 (330). Par la suite, ils ont mis en évidence que cette augmentation du nombre de lymphocytes T régulateur (Treg) était due principalement à une diminution du nombre de lymphocytes CD4⁺CD25⁻, et non à une modification du nombre de Treg (331). Ces résultats suggèrent une meilleure résistance de ces

cellules aux mécanismes apoptotiques qui se mettent en place lors des syndromes septiques (43, 237). Des observations similaires ont été faites chez des patients septiques et traumatisés (332, 333) ou dans des modèles expérimentaux (334-336). Les Treg sont caractérisés par l'expression d'un facteur de transcription spécifique : Foxp3 (*forkhead box P3*) (337, 338). Il a été montré récemment que l'expression de Foxp3 était corrélée aux fonctions des Treg (337-340). Ces cellules possèdent des propriétés régulatrices jouant un rôle essentiel dans le contrôle non seulement de la réponse immunitaire adaptative mais également innée. Ces fonctions sont médiées par des mécanismes dépendant des cytokines (production d'IL-10, de TGF- β , expression de CD25 qui adsorbe l'IL-2 etc.) et par contact direct avec les cellules cibles (libération de granzyme A, induction de l'apoptose par interaction de CD95-CD95 ligand, mise en jeu de co-signaux inhibiteurs via *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* [CTLA-4] ou *Lymphocyte-activation gene 3* [LAG-3], **Figure 25**) (339, 341, 342).

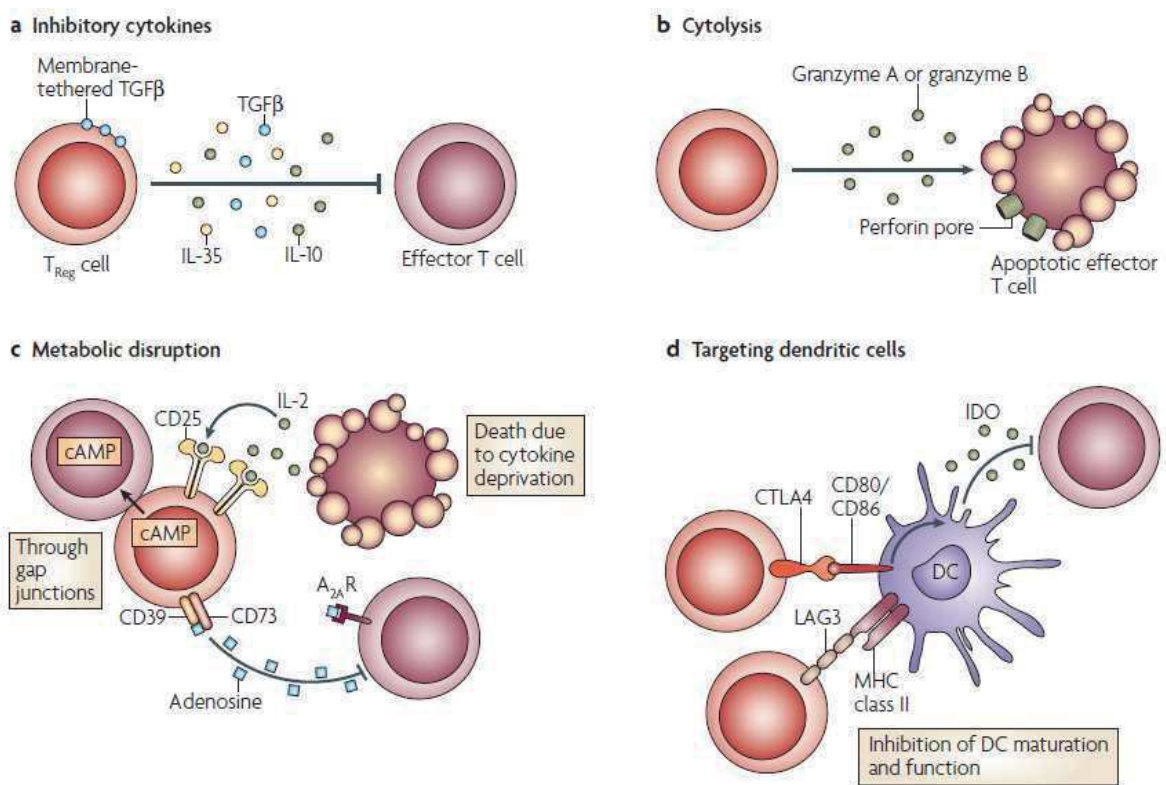


Figure 25 : Principaux mécanismes suppresseurs des Treg (342)

A_{2A}R : adenosine receptor 2A, cAMP : cyclic adenosine monophosphate, DC : dendritic cell, IDO : indoleamine 2,3 dioxygenase, LAG-3 : lymphocyte-activation gene 3

Dans une cohorte de patients en choc septique, la perte de prolifération de cellules mononucléées du sang périphérique en réponse à un mitogène ou à des antigènes de rappel a été corrélée au pourcentage de Treg circulants (343). La baisse du pourcentage de Treg par la transfection de lymphocytes spléniques avec des ARN silencieux FoxP3 chez la souris septique, a permis de restaurer la prolifération lymphocytaire (343). Deux études récentes ont

observé sur un modèle murin de CLP que l'administration d'agonistes anti-*Glucocorticoid-Induced Tumor-necrosis factor Receptor* (GITR, exprimé de manière constitutive à la surface des Treg) connus pour bloquer les fonctions régulatrices des Treg, améliorait *ex vivo* la prolifération des cellules T effectrices ainsi que la production de cytokines et s'accompagnait *in vivo* d'une augmentation de la survie des souris traitées (336, 344). Ces résultats sont en faveur d'une participation des Treg dans le développement de l'anergie lymphocytaire après un choc septique. Les Treg interviendraient aussi dans la mise en place de l'apoptose des monocytes et des PNN (345, 346). Cependant, le lien causal entre cette modification des fonctions régulatrices et le pronostic des patients septiques ou des traumatisés reste encore à déterminer en clinique.

5.2.2.2.4. Modulation de l'expression des molécules co-stimulatrices

Pour être activés de façon optimale, les lymphocytes T doivent recevoir un signal spécifique résultant de l'activation du TCR suite à son interaction avec le complexe antigène-CMH, et un second signal co-stimulateur indépendant de l'antigène (**Figure 26**) (347, 348). Ces seconds signaux ont pour rôle de moduler l'activation du TCR (347) : ils peuvent être activateurs ou inhibiteurs en fonction de s'ils augmentent ou inhibent (respectivement) la réponse induite par l'activation du TCR (349).

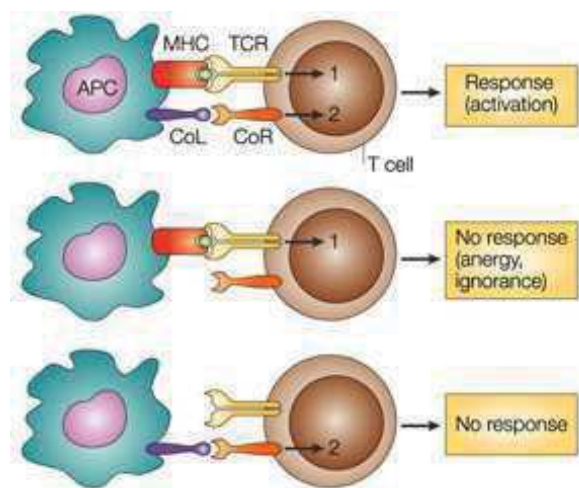


Figure 26 : Modèle des deux signaux nécessaires à l'activation lymphocytaire (347)

CoL : co-stimulatory ligand, CoR : co-stimulatory receptor

Les co-signaux sont délivrés majoritairement par des molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines ou du TNF- α (347). Différents systèmes ont été décrits jusqu'à maintenant et pourraient intervenir à plusieurs étapes clés de la maturation des lymphocytes T (activation, expansion clonale, différenciation, élimination de la cible).

Au cours de la phase de reprogrammation cellulaire, les lymphocytes circulants sont caractérisés par une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation associée à une augmentation de celle des facteurs inhibiteurs.

5.2.2.2.4.1. Diminution de l'expression des molécules co-activatrices

Dans une cohorte de 21 patients en choc septique, l'expression des molécules CD3 à la surface des lymphocytes T était significativement réduite par rapport à celle des sujets sains (350). Une diminution similaire de l'expression du CD3 a été observée au niveau de l'ARNm chez des patients ayant développé un sepsis ou un sepsis sévère suite à une opération chirurgicale (351) ou à la surface des lymphocytes anergisés de polytraumatisés (anergie définie comme une prolifération lymphocytaire très réduite après stimulation par la phytohémagglutinine) (352).

La molécule CD28 est un co-activateur important qui génère un signal d'activation aux lymphocytes suite à la fixation de ses ligands : les molécules CD80 (ou B7.1) et CD86 (ou B7.2) (347). Il a été observé que l'expression du CD28 était réduite à la surface des lymphocytes anergisés de polytraumatisés, ce qui pouvait contribuer à l'activation incomplète de ces cellules (352).

5.2.2.2.4.2. Augmentation de l'expression des molécules co-inhibitrices

Différents systèmes co-inhibiteurs existent à la surface des cellules immunitaires, notamment des molécules de la famille B7-CD28 comme *Programmed Death-1* (PD-1), CTLA-4 ou *B and T lymphocyte attenuator* (BTLA) (353). Dans une cohorte de polytraumatisés, seuls les lymphocytes T anergisés (ayant une prolifération réduite par rapport aux cellules de sujets sains après stimulation par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28) avaient une expression plus élevée des molécules co-inhibitrices CTLA-4 et PD-1 (354). Les niveaux d'expression des molécules qui participent à la transduction du signal négatif (ex. : phosphatase *Src homology region 2-domain containing tyrosine phosphatase 1* [SHP-1], ubiquitin ligase c-Cbl) étaient également augmentés dans les cellules anergisées (354). Ces résultats ont été confirmés au niveau de l'expression ARNm dans une autre population de polytraumatisés (355). Dans un modèle murin d'infection par *Listeria monocytogenes*, les molécules BTLA ont été impliquées dans les mécanismes suppresseurs de l'immunité innée qui sont délétères pour la clairance bactérienne à la phase aiguë de l'atteinte (356).

Dans le cadre de l'étude de l'implication de ces co-signaux inhibiteurs dans les dysfonctions immunitaires du choc septique, nous nous sommes particulièrement intéressés au système de co-signalisation inhibiteur PD-1.

5.2.2.3. Le système PD-1

D'une manière simplifiée, les molécules de la famille CD28:B7 fonctionnent sur le modèle « ligand/récepteur ». Ainsi, CD80 et CD86 sont les ligands de CTLA-4, *Programmed-death Ligand 1* (PD-L1, B7-H1 ou CD274) et PD-L2 (B7-DC ou CD273) sont les ligands de PD-1 (CD279) (**Figure 27**). Il existe aussi d'autres systèmes mettant en jeu B7-H4 et BTLA (357).

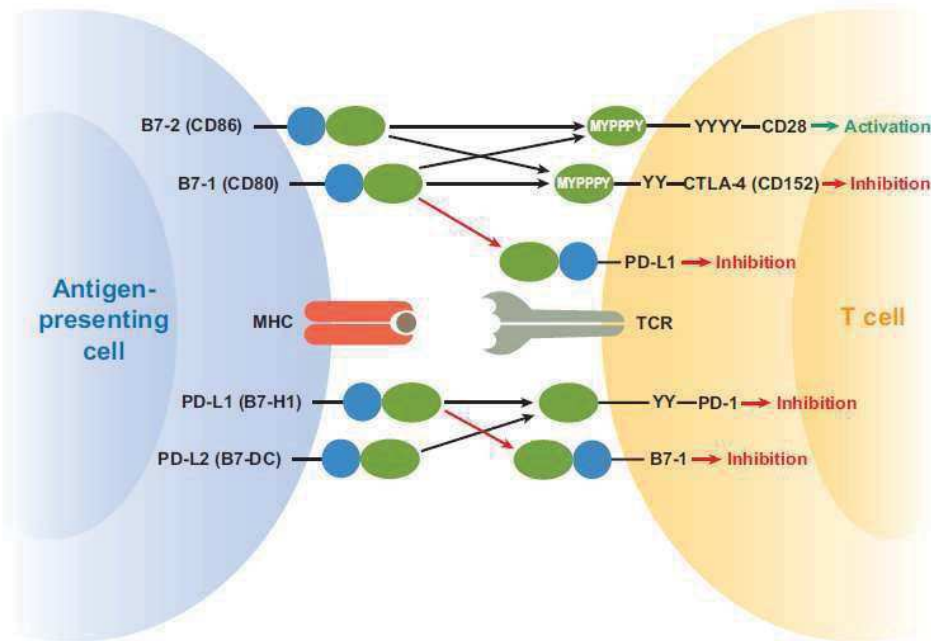


Figure 27 : Plusieurs systèmes de co-stimulation de la famille B7:CD28 (357)

La molécule PD-1 a tout d'abord été mise en évidence lors de travaux portant sur l'induction de la mort programmée de deux lignées cellulaires (hybridome de cellules T et progéniteur lymphoïde/myéloïde cellulaire) (358). Les ligands de PD-1 ont été plus tardivement identifiés. Compte tenu des similitudes de structure entre PD-1 et CTLA-4, il a été supposé que ses ligands puissent appartenir à la famille B7, ce qui a été confirmé en 2000 et 2001 par l'identification des ligands PD-L1 et PD-L2 (359-362).

5.2.2.3.1. Expression et structure protéiques

PD-1 est une protéine transmembranaire de type I composée de plusieurs domaines : un domaine extracellulaire IgV-like commun à la famille des immunoglobulines, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire contenant un *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) et un *Immunoreceptor tyrosine-based switch motif* (ITSM) (363).

PD-1 semble être monomérique en solution ou à la surface des cellules, ce qui suggère un signal de transduction différent de celui des autres membres de la famille B7 qui fonctionnent en dimère covalent (ex : CTLA-4) (364).

PD-L1 et PD-L2 sont des protéines transmembranaires de type I qui possèdent un domaine extracellulaire IgV-like (intervenant dans la liaison à PD-1) et IgC-like (357, 361) et présentent une forte similitude : près 40 % des acides aminés les composant sont similaires (365). Le domaine intracellulaire de PD-L1 et PD-L2 est très court (30 acides aminés) et ne semble pas contenir de motif connu de signalisation. Pourtant, certaines équipes ont montré que la liaison des ligands au récepteur PD-1 pouvait induire un signal dans les cellules exprimant les ligands. Cette hypothèse de signal bidirectionnel reste à éclaircir (357).

Concernant la fixation des ligands PD-L à PD-1, la liaison d'un des ligands au récepteur PD-1 empêcherait la liaison de l'autre ligand de manière concentration-dépendante (366). En termes d'affinité des ligands à PD-1, des résultats différents ont été rapportés : il a été montré que PD-L1 et PD-L2 se liaient avec la même affinité à PD-1, ou que PD-L2 avait une affinité 2 à 6 fois supérieure à celle de PD-L1 (366, 367).

5.2.2.3.2. Expression cellulaire des molécules du système PD-1

L'expression de PD-1 est plus large que celle des autres membres de la famille B7 limitée aux lymphocytes T (365). En effet, PD-1 peut être exprimé sur les lymphocytes T ou B, les cellules *natural killer* T, les monocytes activés ou les cellules dendritiques (**Figure 28**) (357). PD-1 n'est pas exprimé sur les lymphocytes T ou B au repos mais son expression est induite après activation de ces cellules par différents composés (ex. pour les lymphocytes T : anticorps anti-CD3, billes avec anticorps CD3/CD28, concanavaline A, PMA ou phytohémagglutinine) (368-370).

L'expression de PD-L1 chez la souris est constitutive sur les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules souches mésenchymateuses et les mastocytes dérivant de la moëlle (357, 372, 373). Cette expression basale peut être encore augmentée après activation cellulaire, notamment après exposition à du LPS, de l'IFN- γ ou des anticorps anti-CD3 (en fonction des cellules) (372-374). Chez l'homme, les monocytes circulants et les lymphocytes T naïfs (CD4⁺ ou CD8⁺) n'exprimeraient pas (ou peu) PD-L1 constitutivement mais ils peuvent l'exprimer après activation (**Figure 28**) (359, 360, 375). De plus, PD-L1 est aussi présent sur une grande variété de cellules non hématopoïétiques (dont les cellules endothéliales, le tissu cardiaque, pancréatique, intestinal ou placentaire chez la souris (376) ; les cellules épithéliales thymiques, placentaires, cancéreuses ou endothéliales chez l'homme (375, 377)).

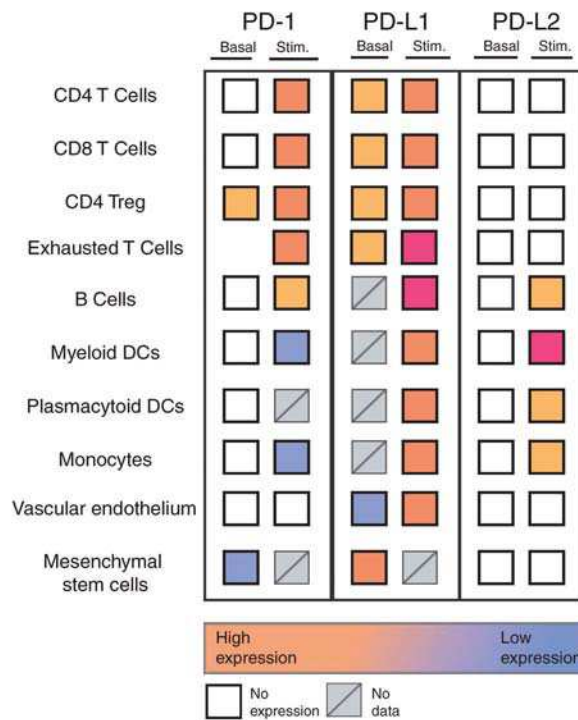


Figure 28 : Expression cellulaire des molécules du système PD-1 en fonction de leur état d'activation (371)

PD-L2 a une expression protéique beaucoup plus restreinte par rapport à celle de PD-L1. En effet, l'expression de PD-L2 ne serait inducible que sur les cellules dendritiques, les macrophages et les mastocytes dérivés de la moelle (**Figure 28**) (362, 372, 373, 375, 378). Cependant une étude récente a montré que l'expression de PD-L2 pouvait aussi être induite à la surface des lymphocytes T humains (CD4⁺ ou CD8⁺) après activation (379). Contrairement à PD-L1, PD-L2 ne serait pas exprimé (chez la souris) sur les cellules non hématopoïétiques telles que les cellules des tissus cardiaques, intestinaux ou placentaires (376). Cependant, il a été montré dans une étude que PD-L2 était exprimé de manière constitutive sur des cellules endothéliales humaines de cordons ombilicaux (380). Enfin, il semble que l'expression de PD-L2 soit induite par des stimuli différents de ceux de PD-L1 avec notamment une forte induction par l'IL-4 et une induction moindre par l'IFN- γ ou le GM-CSF (372, 374, 375, 380).

5.2.2.3.3. Signalisation des molécules PD-1 et PD-L

Le rôle des systèmes co-activateurs ou co-inhibiteurs est de modifier la transduction du signal des récepteurs à l'antigène. Pour pouvoir médier leur effet modulateur, les récepteurs PD-1 doivent physiquement être localisés à proximité du récepteur à l'antigène des lymphocytes T (381). Une redistribution des molécules PD-1 est observée à la surface de la cellule lymphocytaire lors de l'interaction entre le TCR et le complexe antigène-CMH, avec une

concentration de PD-1 au niveau de la synapse immunologique (382). Le même processus de concentration est décrit pour PD-L1 et PD-L2 à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (382).

La liaison de PD-1 avec ses ligands (concomitante avec l'engagement du TCR) induit la phosphorylation des tyrosines de son domaine intracellulaire, et le recrutement de phosphatases telles que SHP-1 et SHP-2 au niveau des motifs ITSM (principalement) et ITIM de la molécule PD-1 (370). Le récepteur PD-1 étant localisé à proximité du TCR, les phosphatases vont pouvoir déphosphoryler des molécules intermédiaires de la cascade de signalisation et s'opposer ainsi au signal d'activation du récepteur à l'antigène (383). Les phosphatases mises en jeu bloqueraient l'activation de la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) par le CD28, empêchant celle de Akt (une sérine/thréonine kinase) qui intervient dans le métabolisme cellulaire (glycolyse ou expression de transporteurs du glucose au niveau de la membrane plasmatique) ou dans la production d'IL-2 (**Figure 29**) (357, 384, 385). Les phosphatases recrutées s'opposeraient aussi (via le blocage de PI3K) à l'expression du facteur de survie BCL-XL induite par le système co-activateur CD28, augmentant la susceptibilité des cellules à l'apoptose (384). L'effet inhibiteur de PD-1 serait médié également par l'inhibition de la phosphorylation d'autres molécules de la cascade d'activation du TCR telles que ZAP70, les sites *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) de CD3 ζ , la protéine kinase C θ ou l'*extracellular signal-related kinase* (ERK) membre de la famille des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (386).

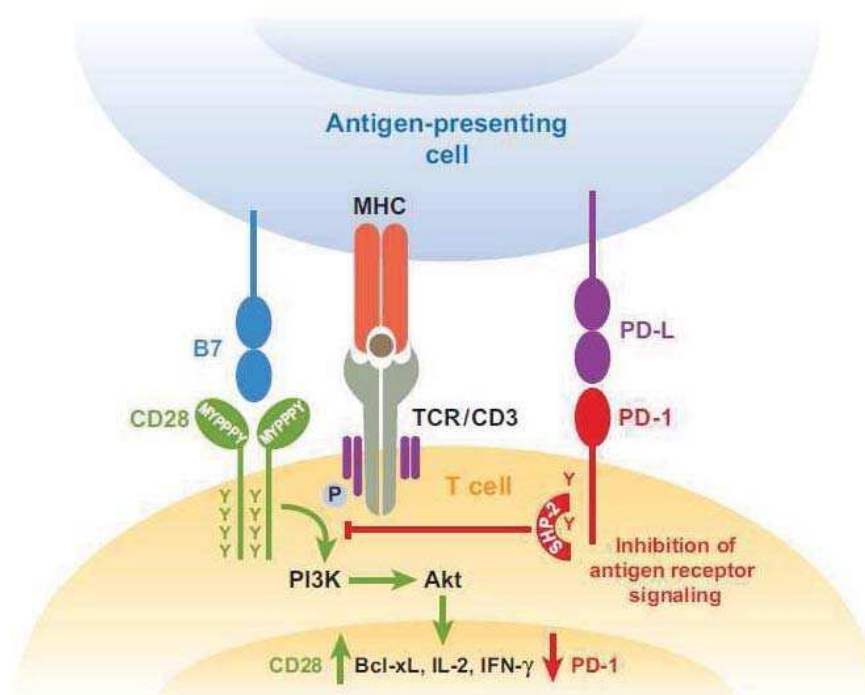


Figure 29 : Signalisation induite par la fixation de PD-1 à ses ligands PD-L (357)

Au final, l'effet inhibiteur de PD-1 se traduit par une baisse de la prolifération des lymphocytes T (359, 361, 387, 388), une diminution de la production de cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL2 ou l'IL-4 (359, 361, 370, 387, 388), un ralentissement voire un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 (361, 370, 387), une baisse de la mobilisation du calcium intracellulaire (383) et pourrait réduire l'adhésion des lymphocytes T aux intégrines (388) ou le temps de contact entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques, s'opposant ainsi à l'activation lymphocytaire (389).

Le signal inhibiteur délivré par le système PD-1 semble dépendre de la force du signal du TCR, avec un effet plus important lorsque le niveau de stimulation du TCR est faible. En effet, dans des modèles *in vitro*, l'effet inhibiteur de PD-1 a pu être surmonté dans des conditions saturantes d'activation du TCR (par l'emploi d'anticorps anti-CD3), en présence d'une co-stimulation importante par le CD28 (emploi d'anticorps anti-CD28) (359) ou après ajout d'IL-2 (effet dose-dépendant) (387).

5.2.2.3.4. Rôle physiopathologique des molécules du système PD-1

5.2.2.3.4.1. Tolérance et auto-immunité

Dans les conditions physiologiques, les molécules du système PD-1 interviennent dans les mécanismes d'auto-immunité. En effet, il a été montré chez des souris *knock-out* (KO) pour le gène codant PD-1 qu'elles développaient spontanément des dysfonctions de type auto-immunes pouvant être fatales comme une cardiomyopathie dilatée auto-immune avec présence d'anticorps dirigés contre des protéines cardiaques (souris BALB/c) ou une glomérulonéphrite et une arthrite de type lupique avec dépôt d'immunoglobulines (souris C57BL/6) (390, 391). Chez l'homme, plus de 30 polymorphismes nucléotidiques simples ont été identifiés sur le gène codant PD-1 et plusieurs ont été associés avec une susceptibilité accrue pour certaines pathologies auto-immunes (ex. : lupus érythémateux systémique, diabète de type I ou polyarthrite rhumatoïde) (363, 392).

Le système PD-1:PD-L intervient à la fois au niveau des mécanismes de tolérance centrale (dans les processus de sélection des thymocytes) et de tolérance périphérique en limitant l'activation et l'expansion des lymphocytes T auto-réactifs naïfs, ainsi qu'en régulant les fonctions des lymphocytes T auto-réactifs effecteurs (371, 392). L'expression du ligand PD-L1 sur les cellules endothéliales ou d'autres cellules non-hématopoïétiques semble aussi contribuer au maintien de la tolérance au niveau tissulaire (380, 393). Enfin, le système PD-1

interviendrait dans la régulation des fonctions immunomodulatrices des lymphocytes Treg. En effet, il a été montré récemment dans un modèle murin que le récepteur PD-1 était exprimé par les lymphocytes Treg et qu'une augmentation de son expression était associée à des capacités immunosuppressives accrues de ces cellules (394). De plus, PD-L1 serait capable de promouvoir le développement de lymphocytes Treg induits et de maintenir leurs fonctions suppressives après induction (395).

5.2.2.3.4.2. Pathologies infectieuses

Les molécules du système PD-1:PD-L ont beaucoup été étudiées dans le cadre des pathologies infectieuses virales chroniques (hépatites B et C ou infection due au VIH) (396-398). Au cours de ces pathologies, les lymphocytes T présentent un état « d'épuisement » c'est-à-dire une altération de leurs propriétés effectrices qui semble apparaître de manière hiérarchisée. Pour les lymphocytes T CD8⁺, la production de cytokines (IL-2, TNF- α et IFN- γ), les propriétés de cytolyse et de prolifération cellulaire en réponse à l'antigène sont perdues (399, 400). Les lymphocytes T CD4⁺ présentent aussi des dysfonctions telles qu'une baisse de production de l'IL-2, du TNF- α et de leur capacité à proliférer (396, 401). Ces dysfonctions lymphocytaires pourraient expliquer l'incapacité de l'organisme à éliminer le pathogène responsable de l'infection.

Une des premières études qui a mis en lien ces dysfonctions lymphocytaires avec l'expression de PD-1 a été conduite par Barber *et al.* en 2006. Dans un modèle murin d'infection induite par une souche de *lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV), ils ont montré que chez les souris chroniquement atteintes, les lymphocytes CD8⁺ spécifiques au virus qui avaient des dysfonctions (altération de la prolifération ou de la production d'IFN- γ) exprimaient plus fortement PD-1 par rapport aux lymphocytes CD8⁺ des souris ayant pu éliminer rapidement le virus (402). De plus, l'emploi d'anticorps bloquants anti-PD-L1 permettait d'augmenter le nombre des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques, d'améliorer leur capacité à produire des cytokines (IFN- γ et TNF- α) et ainsi de réduire la charge virale des souris infectées (402).

Des résultats similaires ont ensuite été rapportés dans d'autres modèles de pathologies chroniques virales chez l'homme (hépatite B, hépatite C ou VIH) avec une augmentation de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes CD8⁺ ou CD4⁺ spécifiques de l'agent infectieux (399, 401, 403-410). De plus, différentes dysfonctions étaient améliorées après l'ajout d'anticorps bloquants le système PD-1:PD-L telles que la capacité proliférative des cellules lymphocytaires T spécifiques, leur production de cytokines (IL-2, IFN- γ ou TNF- α) ou l'activité cytotoxique des lymphocytes CD8⁺ (399, 401, 403, 404, 406-408, 410, 411).

Dans ces pathologies, quelques études se sont également intéressées aux cellules présentatrices de l'antigène et ont montré que chez des patients atteints d'hépatite B, les cellules dendritiques myéloïdes sur-exprimaient PD-L1 et avaient une capacité moindre à induire la prolifération des cellules lymphocytaires ou la production lymphocytaire d'IL-2 et d'IFN- γ . Ces altérations étaient nettement améliorées en présence d'anticorps anti-PD-L1 (412). Des résultats similaires ont été obtenus vis-à-vis de monocytes de patients atteints d'hépatite C sur-exprimant PD-L1 (413). De plus, dans une étude menée sur des patients ayant une infection par le VIH, il a été montré que leurs monocytes exprimaient fortement PD-1 par rapport à des sujets sains. L'activation des molécules PD-1 à la surface des monocytes induisait une forte production d'IL-10 monocyttaire qui était responsable d'une diminution des capacités prolifératives des lymphocytes mis en culture en leur présence (en réponse à différents antigènes) (414).

Dans les pathologies virales chroniques, les molécules du système PD-1:PD-L à la surface des cellules lymphocytaires et des cellules présentatrices de l'antigène participent donc aux dysfonctions immunitaires observées. Ces molécules ont également été étudiées dans le cadre de pathologies chroniques bactériennes (ex. : infections par *Helicobacter pylori* ou par *Mycobacterium tuberculosis*) ou parasitaires (ex. : *Schistosoma mansoni*) où elles interviendraient dans les mécanismes responsables de l'incapacité de l'organisme à éliminer ces pathogènes (357). Par exemple, après exposition à *Helicobacter pylori*, les cellules épithéliales gastriques humaines (qui ont une fonction équivalente à celle des cellules présentatrices de l'antigène) sur-expriment PD-L1 à leur surface et sont ainsi capables d'induire le développement de lymphocytes Treg fonctionnels ou de provoquer l'apoptose de lymphocytes T, réduisant ainsi les capacités de l'organisme à éliminer le pathogène (415-417).

Le rôle des molécules PD-1:PD-L a été beaucoup moins étudié dans les pathologies infectieuses à la phase aiguë de l'atteinte (418, 419). Concernant les pathologies virales, dans les quelques études cliniques menées, il semble que PD-1 soit rapidement exprimé à la surface des lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ dès la phase aiguë de l'hépatite B (403, 420) ou de l'hépatite C (408, 421), quelque soit l'évolution de la pathologie (vers la chronicité ou non). De plus cette induction de l'expression de PD-1 serait présente seulement sur les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du pathogène en cause, car cette expression n'est pas (ou peu) induite sur les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'autres virus tels que le virus *influenza*, *Epstein-barr* ou *cytomegalovirus* (407, 408, 420). Au cours de l'hépatite B, les lymphocytes T CD8⁺ exprimant PD-1 seraient plus sensibles aux mécanismes apoptotiques que les cellules

négatives pour PD-1, ce qui pourrait être induit via les molécules PD-L1 fortement exprimées au niveau hépatocytaire (420).

Au niveau fonctionnel, dans l'étude de Zhang *et al.*, les anticorps bloquants anti-PD-L1 ont permis d'améliorer la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de plusieurs patients (atteints d'hépatite B), ainsi que la production d'interleukines TNF- α ou IFN- γ , de réduire la production d'IL-10 et le nombre de lymphocytes T CD8⁺ apoptotiques (420). Au contraire, Nakamoto *et al.* ont montré que pour un patient atteint d'hépatite C à la phase aiguë, la perte de la capacité proliférative de ses lymphocytes T CD8⁺ HCV-spécifiques n'était pas compensée après ajout d'anticorps bloquants le système PD-1:PD-L (407). Les auteurs expliquent cela en partie par la sur-expression concomitante d'un autre système co-inhibiteur (CTLA-4) (422).

Concernant les infections bactériennes aiguës, peu d'études se sont intéressées à l'implication du système PD-1:PD-L dans les dysfonctions immunitaires. Dans des modèles murins utilisant le procédé de CLP pour induire un sepsis, l'expression de PD-1 est augmentée sur les lymphocytes B et T (CD4⁺ et CD8⁺) et sur les monocytes circulants des souris septiques par rapport aux souris contrôle, et l'expression de PD-L1 est induite sur les lymphocytes B et les monocytes circulants ou les macrophages péritonéaux (423-425).

Le système PD-1:PD-L semble jouer un rôle important lors du sepsis car les souris KO pour PD-1 ou les souris sauvages traitées avec des anticorps bloquants (anti-PD-L1 ou anti-PD-1, reçus avant ou après la CLP) ont un pourcentage de survie plus important que les souris exprimant PD-1 (423-425). Le système PD-1:PD-L interviendrait au niveau des mécanismes apoptotiques car après CLP, les souris sauvages traitées avec des anticorps bloquants (anti-PD-1 ou anti-PD-L1) ont un nombre réduit de cellules apoptotiques spléniques (lymphocytes B et T et cellules dendritiques) et thymiques (423, 424).

Chez l'homme, il a été montré que l'expression de PD-1 est augmentée sur les monocytes de patients en choc septique par rapport à des sujets sains (425). Ce résultat observé dans une petite cohorte de patients (n=5) reste à confirmer et l'étude des molécules du système PD-1 (PD-1 et ses ligands) devrait être étendue au versant lymphocytaire.

5.2.2.3.4.3. Pathologies cancéreuses

Les cellules cancéreuses ont développé différents systèmes pour échapper à leur élimination par le système immunitaire : notamment une diminution de l'expression des molécules de CMH de classe I altérant leur reconnaissance par les lymphocytes T, ou la production de cytokines immunosuppressives (IL-10 ou TGF- β) (426). L'expression des molécules du

système PD-1:PD-L serait un autre mécanisme utilisé par les cellules cancéreuses (427). En effet, l'expression de PD-L1 a été détectée à la surface de cellules tumorales d'origine humaine (428, 429) ou murine (430). Cette expression au niveau des cellules tumorales serait même associée à un mauvais pronostic des patients (431-433). Les cellules immunitaires présentes sur le site tumoral expriment également ces molécules : PD-1 est détecté sur les lymphocytes T CD8⁺ (434) et PD-L1 sur les cellules dendritiques (435). Cette expression sur les cellules immunitaires pourrait être induite par les cellules cancéreuses (436) ou des facteurs produits au niveau du micro-environnement tumoral (435). L'expression des molécules PD-1:PD-L a été associée à des dysfonctions immunitaires telles que pour les lymphocytes T CD8⁺ : une baisse de leurs propriétés cytotoxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses lorsqu'ils sur-expriment PD-1 (436), une susceptibilité accrue des lymphocytes T CD8⁺ vis-à-vis de l'apoptose en présence de cellules tumorales sur-exprimant PD-L1 (428) ; et pour les cellules dendritiques ayant une expression accrue de PD-L1 : une diminution de leur capacité à stimuler les lymphocytes T cytotoxiques (435). *Ex vivo* ou *in vitro* chez l'animal, le blocage du système PD-1:PD-L a permis d'améliorer les défaillances immunitaires anti-tumorales citées ci-dessus (428, 435, 436). Chez l'homme, l'utilisation d'anticorps anti-PD-1 semble bien tolérée et pourrait constituer une nouvelle piste thérapeutique, notamment chez les patients atteints de tumeur solide réfractaire au traitement habituel (437).

En conclusion, l'altération des fonctions effectrices des cellules immunitaires, en particulier des monocytes et des lymphocytes, conduit à un état d'immunodépression plus ou moins persistant qui se traduit au niveau clinique par une difficulté à éliminer les agents pathogènes et un risque plus important des patients septiques à développer des infections nosocomiales ou opportunistes (438). Une étude post-mortem regroupant 235 patients ayant développé un sepsis sévère ou un choc septique après une chirurgie a montré que 80 % de ces patients présentaient au moins un foyer infectieux encore actif au moment de leur décès. Or pour certains d'entre eux, la durée de leur hospitalisation en service de réanimation dépassait 7 jours, ce qui témoigne de la difficulté de ces patients à éliminer le(s) pathogène(s) (109). Les infections nosocomiales se développent chez plus de 20 % des patients septiques (55, 439). En plus des facteurs intrinsèques (sévérité de l'atteinte et altération immunitaire), des facteurs extrinsèques (recours à la ventilation mécanique, au cathéter central pour de nombreux patients, etc.) interviennent aussi (440). Concernant les infections opportunistes, plusieurs études ont relevé une fréquence importante de *Herpes simplex virus* au niveau du tractus

respiratoire supérieur des patients hospitalisés en service de soins intensifs (22-32 %) et encore plus élevée (jusqu'à 54 %) pour des patients sous ventilation depuis plus de 5 jours, en comparaison de la population générale (2-3 %) (441-443). Des réactivations du *Cytomegalovirus* ont aussi été rapportées chez près d'un tiers des patients en sepsis sévère (444, 445) (**Figure 30**) ainsi qu'une fréquence anormalement augmentée d'infections dues à des fungi tels que *Candida spp* ou *Aspergillus spp*. Elles seraient associées à un risque accru de mortalité (446-449). Dans une étude internationale menée dans 1 265 services de réanimation, il a été observé une prévalence d'infection à *Candida spp* de 6,87 pour 1 000 patients de réanimation (principalement dues à *Candida albicans*) et une mortalité hospitalière associée de 42,6 % (ce qui était supérieure à la mortalité <30 % des patients ayant une infection bactérienne) (450).

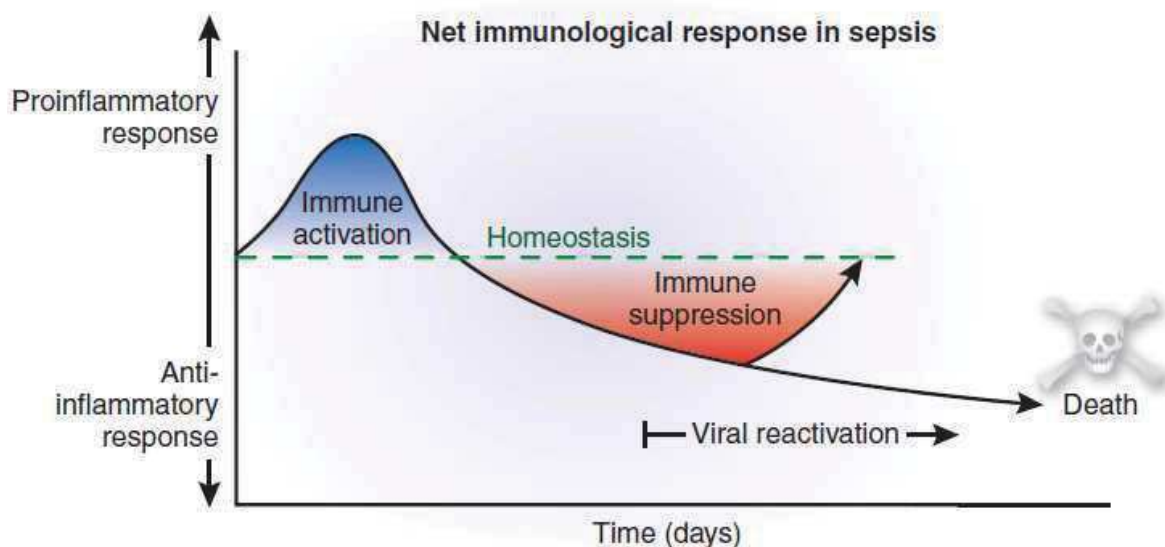


Figure 30 : Evolution de la réponse immunitaire au cours du temps lors des états septiques et risque de réactivation virale (438)

Cependant, l'état d'immunodépression généralisé est remis en question dans plusieurs études qui montrent qu'il y a une compartimentalisation de la réponse immunitaire (247, 451, 452) : ainsi, la réponse anti-inflammatoire serait limitée au compartiment systémique, le but pouvant être de protéger l'organisme contre une diffusion de la réponse inflammatoire systémique ou de ne pas compromettre le chimiotactisme nécessaire des cellules sur le site de l'infection. Au contraire, au niveau local sur le site primaire de l'infection, les cellules exposées à plusieurs types de signaux d'activation (induits par exemple par l'endotoxine, d'autres composés bactériens, l'anaphylatoxine C5a, l'hypoxie etc.) continueraient à produire des cytokines pro-inflammatoires (247, 453). Cet aspect de la physiopathologie septique avec compartimentalisation ou non de la réponse immune est un élément important à éclaircir car il

a des conséquences sur la stratégie thérapeutique immunomodulatoire à développer et sur le monitoring de la réponse des patients septiques à ces traitements potentiels.

6. Prise en charge thérapeutique

6.1. Les thérapeutiques prioritaires du sepsis sévère

6.1.1. Traitement de l'infection

Le traitement de l'infection comprend deux volets : le contrôle de la source de l'infection et l'administration d'une antibiothérapie adaptée.

D'après les recommandations internationales, l'identification du site anatomique du foyer infectieux doit être établie rapidement, et dans la mesure du possible, doit être suivie par le contrôle de la source. En règle générale, ce contrôle n'est pratiqué qu'après l'initiation de l'antibiothérapie et une fois que le patient est hémodynamiquement stabilisé (454). Cependant la notion d'urgence est à adapter en fonction des cas. Le contrôle de la source consiste en une intervention physique ayant pour but d'enlever le foyer de l'infection et de restaurer des fonctions anatomiques normales. Il comprend l'opération de drainage (ex. : pour un abcès), le débridement de tissus (ex. : retrait de tissus nécrosés) ou le retrait de dispositifs médicaux potentiellement infectés (455).

Pour ce qui est de l'antibiothérapie, elle doit être débutée en intraveineuse le plus tôt possible, dans la première heure après le diagnostic du sepsis sévère ou du choc septique (456), être à large spectre initialement et avoir une bonne pénétration au niveau du site présumé de l'infection (454). L'antibiothérapie doit être réévaluée quotidiennement dans un but d'optimisation de l'efficacité, de prévention des résistances ou de la toxicité, et de minimisation des coûts. En général, l'antibiothérapie est administrée 7 à 10 jours (454).

Deux éléments sont essentiels dans la prise en charge de l'infection : le délai de mise sous traitement et l'efficacité de l'antibiothérapie choisie vis-à-vis des microorganismes en cause. Plusieurs études ont montré que plus le délai de mise sous antibiothérapie efficace était court, plus les chances de survie des patients étaient importantes (456-460). Par exemple, dans l'étude de Kumar *et al.* incluant des patients en choc septique, chaque heure additionnelle dans ce délai d'administration (dans les 6 premières heures suivant le début de l'hypotension) était associée à une baisse de la survie de 7,6 % (**Figure 31**) (457).

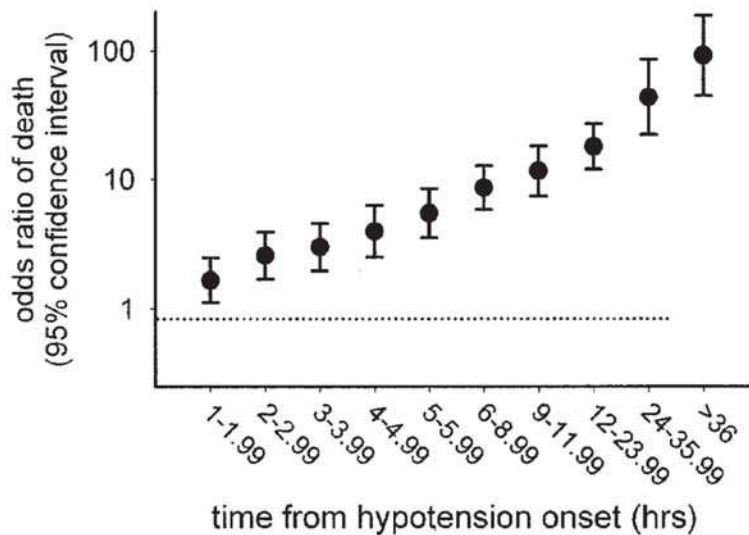


Figure 31 : Relation entre le délai de mise en place de l'antibiothérapie et le risque de mortalité des patients en choc septique (457)

Différentes causes peuvent induire un retard dans le délai d'administration d'antibiotiques efficaces : des difficultés à identifier une infection (ex. : patient apyrétique), une antibiothérapie différée après le prélèvement des hémocultures ou après le transfert hors du service des urgences, ou une antibiothérapie initiale non efficace contre les germes en cause (458). Une étude menée sur près de 6000 patients en choc septique a montré que 20 % d'entre eux avaient reçu une antibiothérapie initiale inappropriée, ce qui était associé à une diminution de près de 5 fois leur chance de survie (461). Cependant, il est à noter que la notion d'efficacité de l'antibiothérapie a certaines limites. En effet, elle repose en général sur des tests *in vitro* qui reflètent mal l'effet réel des antibiotiques *in vivo* car ne tenant pas compte des doses administrées ou des problèmes de distribution et d'élimination de ces molécules. Ces problèmes peuvent être dus aux autres traitements administrés (ex. : molécules aux propriétés hémodynamiques pouvant modifier la clairance rénale, recours à l'hémodialyse) ou aux dysfonctions d'organe des patients (ex. : dysfonction rénale ou hépatique) (462-464).

6.1.2. Traitement hémodynamique

Les patients en sepsis sévère ou en choc septique présentent une hypoperfusion tissulaire associée ou non à une hypotension. Le but du traitement hémodynamique est de rétablir le volume et la pression intravasculaires de façon à restaurer la perfusion tissulaire et permettre au flux sanguin d'assurer à nouveau les besoins métaboliques des tissus.

Le traitement hémodynamique est une urgence chez les patients en choc septique. En 2001, Rivers *et al.* ont montré que la mise en place précoce (dans les 6 premières heures du choc)

d'un protocole de soins standardisé avec des objectifs thérapeutiques définis (**Figure 32**), permettait d'améliorer la survie des patients (diminution de 16 % du risque absolu de mortalité par rapport à une thérapie standard) (465). Il doit être initié rapidement chez le patient septique présentant une hypotension (pression artérielle systolique < 90 mmHg ou baisse > 40 mmHg de la valeur habituelle basale) ou une concentration plasmatique en lactate > 4 mmol/L (454).

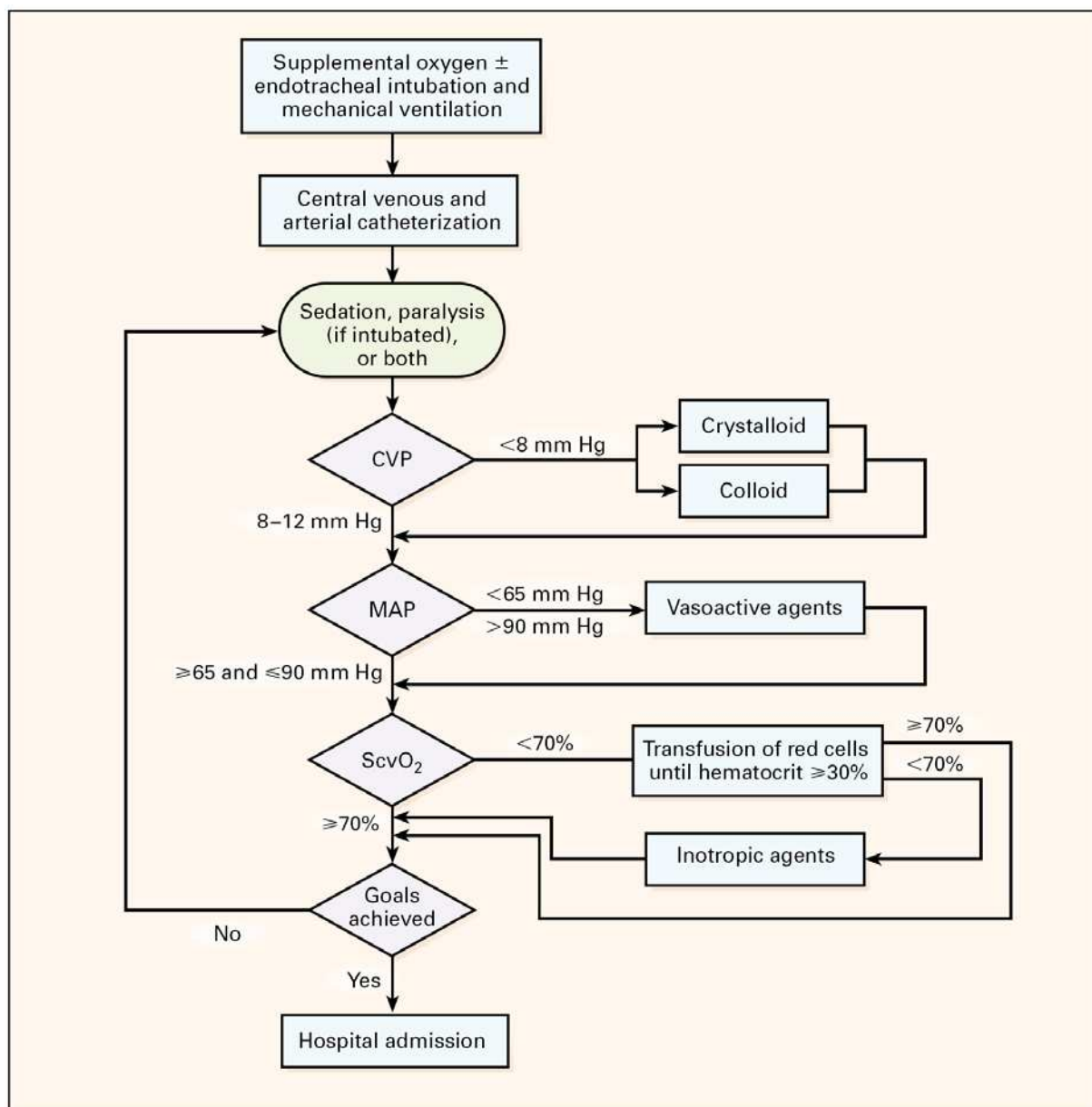


Figure 32 : Prise en charge hémodynamique initiale du sepsis sévère (465)

CVP : central venous pressure, MAP : mean arterial pressure, ScvO₂ : central venous oxygen saturation.

Les premières thérapeutiques utilisées dans cette prise en charge sont les liquides de remplissage, les molécules vasopressives et celles inotropes positives (466, 467).

Il existe deux grands types de liquide de remplissage : les cristalloïdes et les colloïdes qui semblent montrer une efficacité équivalente en termes de survie dans la population générale (468, 469). Un élément important lors de leur perfusion est de pouvoir monitorer l'efficacité du remplissage (phase précoce du choc) et de savoir quand arrêter l'administration avant qu'elle devienne délétère pour le patient (ex. : problème d'œdème pulmonaire) (468). Pour ce faire, lors de la phase précoce du choc, différents paramètres sont mesurés tels que la pression veineuse centrale, la pression artérielle moyenne, le débit urinaire ou des marqueurs indirects d'oxygénation des tissus (ex. : la concentration artérielle en lactate ou la saturation centrale veineuse en oxygène) (468).

En cas d'hypotension persistante malgré la perfusion de liquide de remplissage (ce qui caractérise le choc septique), des molécules vasoconstrictrices sont administrées. D'après les recommandations de 2008 de la *Surviving Sepsis Campaign*, la noradrénaline ou la dopamine sont à administrer en première ligne, l'adrénaline en seconde ligne (454). Une autre alternative est l'administration de vasopressine mais des données supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir mieux définir les bénéfices thérapeutiques potentiels de cette molécule (466).

Si le débit cardiaque d'un patient reste faible après restauration de la pression artérielle, l'administration de molécules inotropes positives peut être envisagée, en particulier celle de la dobutamine avec son effet β_1 -adrénergique sélectif (466, 470).

6.2. Traitements complémentaires de suppléance

6.2.1. Ventilation assistée

Les patients en sepsis sévère ou choc septique ont un risque élevé de développer une défaillance du système respiratoire (471, 472). La présence d'œdèmes au niveau de l'espace alvéolaire ou la baisse de production de surfactant réduisent la compliance pulmonaire et augmentent l'effort nécessaire à la respiration. Il est recommandé de traiter ces patients par ventilation assistée (avec volume courant modéré et pression expiratoire positive sous respirateur) de façon à réduire l'effort fourni par le patient pour respirer et pouvoir lui délivrer un air enrichi en dioxygène (454, 473).

6.2.2. Contrôle glycémique

L'hyperglycémie et la résistance à l'insuline sont très fréquentes lors du sepsis. L'hyperglycémie a différents effets délétères : elle a une action pro-coagulante, altère les fonctions des PNN ou est associée à un risque accru de développer des infections

nosocomiales (474). Ainsi, il est recommandé de contrôler fréquemment la glycémie des patients et de les traiter par une insulinothérapie intraveineuse avec comme glycémie cible $\leq 1,5$ g/L (8,3 mmol/L) (454). L'intérêt de mener une thérapeutique plus agressive avec pour objectif de normaliser la glycémie ($\leq 1,1$ g/L ou 6,1 mmol/L) a été étudié mais les résultats sont controversés : un tel traitement ne semble pas améliorer la survie des patients et s'accompagnerait au contraire d'un risque accru d'hypoglycémie et de décès (475, 476).

6.2.3. Traitement de suppléance de la dysfonction rénale

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) se développe chez près de 10 % des patients avec un sepsis modéré, 23 % avec un sepsis sévère et 51 % avec un choc septique (477). L'association de l'IRA et du sepsis s'accompagne d'une mortalité proche de 70 % (477) ce qui justifie la prise en charge de l'IRA. La purification extracorporelle du sang permet de suppléer les fonctions rénales défaillantes en filtrant le sang à travers une membrane et en retenant ainsi une certaine quantité de fluide et de solutés (toxines, produits de dégradation etc.) (478). Plusieurs techniques sont disponibles : la purification peut reposer sur le principe de diffusion (le transport des solutés est généré par un gradient de concentration à travers une membrane semi-perméable) ou de convection (le transport des solutés est induit par le mouvement d'un solvant à travers une membrane semi-perméable). L'hémodialyse correspond à une clairance par diffusion des solutés, l'hémofiltration à une clairance par convection, et l'hémodiafiltration à une association des deux techniques. Cette dernière serait la plus efficace pour éliminer les molécules de petits, moyens et grands poids moléculaires (479). La purification sanguine peut être réalisée par intermittence ou en continu. La dernière méta-analyse réalisée par le groupe Cochrane n'a pas mis en évidence de réel avantage de l'une par rapport à l'autre des deux techniques (480). Cependant chez les patients hémodynamiquement instables, le traitement en continu est recommandé, alors que chez les patients stabilisés, ce traitement (qui a un sur-coût et nécessite une décoagulation plus importante) n'est pas justifié (480).

Les traitements de purification sanguine ont plusieurs avantages : ils permettent de contrôler l'équilibre acido-basique, de réguler la balance fluidique (évitant toute sur-charge délétère pour le myocarde et les poumons) et de protéger l'encéphale en éliminant les toxines urémiques (478). Il s'est rapidement avéré que les traitements de purification pouvaient aussi être utilisés pour éliminer des médiateurs pro- ou anti-inflammatoires excessivement relargués lors du sepsis sévère, étant pour la plupart hydrosolubles avec un poids moléculaire moyen (479). Les médiateurs inflammatoires étant générés plus rapidement que les toxines urémiques, ils nécessitent d'être éliminés en utilisant un débit de filtration plus important. Des

études menées sur des petites cohortes de patients septiques ont montré que cette technique d'hémodiafiltration semblait avoir des effets bénéfiques en termes d'amélioration de l'hémodynamique et de diminution des besoins en vasopresseurs. Des études sur des cohortes plus importantes de patients sont nécessaires pour en évaluer le bénéfice réel (479). Une autre alternative pour augmenter l'élimination des médiateurs inflammatoires est l'utilisation de membrane avec une porosité augmentée (*High cutoff hemofiltration/hemodialysis*) (479).

Pour améliorer la clairance de médiateurs inflammatoires particuliers, la technique d'hémo-adsorption a été développée. Elle consiste à mettre le sang en contact avec une surface adsorbante telle que des résines ou du charbon activé. La polymyxine B immobilisée sur des fibres de polystyrène permet de fixer spécifiquement l'endotoxine et de réduire ainsi rapidement ses concentrations sanguines. Une méta-analyse récente a montré que ce traitement avait des conséquences bénéfiques au niveau de l'amélioration de la pression artérielle moyenne ou du ratio pression partielle d'oxygène/fraction d'oxygène de l'air inspiré et semblait se traduire par une amélioration de la survie des patients septique (481). Cependant l'absence d'aveugle et le biais de publication justifient de confirmer ces résultats dans des études cliniques plus rigoureuses (481). Une étude de phase III est notamment en cours aux Etats-Unis et doit inclure 360 patients en choc septique recevant une prise en charge standard complétée ou non par une épuration extrarénale avec un dispositif utilisant la polymyxine B (NCT01046669) (482). Un point qui reste à élucider est la capacité de la polymyxine à neutraliser efficacement des endotoxines provenant de bactéries différentes. Par exemple, la polymyxine B serait 1 000 fois moins efficace pour neutraliser du LPS de *Neisseria meningitidis* par rapport à du LPS de *Escherichia coli* (483). Des alternatives à la polymyxine sont envisagées et utilisent d'autres molécules pouvant fixer les endotoxines comme l'albumine humaine ou la diéthylaminoéthyl cellulose. Les résultats intéressants obtenus pour l'instant ne sont que préliminaires (482).

Enfin une technique novatrice actuellement en développement est l'utilisation d'un rein bioartificiel constitué par des cellules tubulaires rénales humaines disposées à la surface interne de fibres et connecté à un circuit de suppléance rénale en continu (484). Une étude multicentrique de phase II sur 50 patients de réanimation a donné des résultats encourageants en termes d'amélioration de la survie des patients (485).

6.3. Nouvelles stratégies thérapeutiques

6.3.1. Protéine C activée

Le sepsis se caractérise par une inflammation exacerbée au niveau systémique et un état pro-coagulant qui induit fréquemment le développement d'une coagulation intravasculaire disséminée (jusqu'à 50 % des patients septiques concernés), aggravant le risque de dysfonction d'organes et de mortalité (486, 487). Ces anomalies sont en partie liées aux dysfonctions des systèmes anti-coagulants, en particulier celui de la protéine C qui joue un rôle complexe à la fois au niveau de la coagulation et de l'inflammation (**Figure 33**) (488-490). Un des mécanismes pouvant expliquer ces dysfonctions serait dû à une faible quantité circulante de protéine C (par défaut de synthèse, consommation ou dégradation accrue) et à une défaillance des mécanismes d'activation conduisant à la protéine C activée (110). C'est ce qui a justifié les essais thérapeutiques qui ont été conduits. En 2001, l'essai PROWESS (*Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis*) incluant près de 1 700 patients en sepsis sévère, a montré que l'administration de protéine C activée recombinante permettait de réduire modestement le risque absolu de mortalité de 6,1 % (491). Suite à ces résultats, la *Food and Drug Administration* américaine et l'Agence Européenne du Médicament ont approuvé la protéine C activée recombinante dans le traitement des patients présentant un sepsis sévère et un risque élevé de mortalité. Depuis cette date, d'autres essais cliniques ont été conduits et ont donné des résultats négatifs ou contradictoires (492, 493).

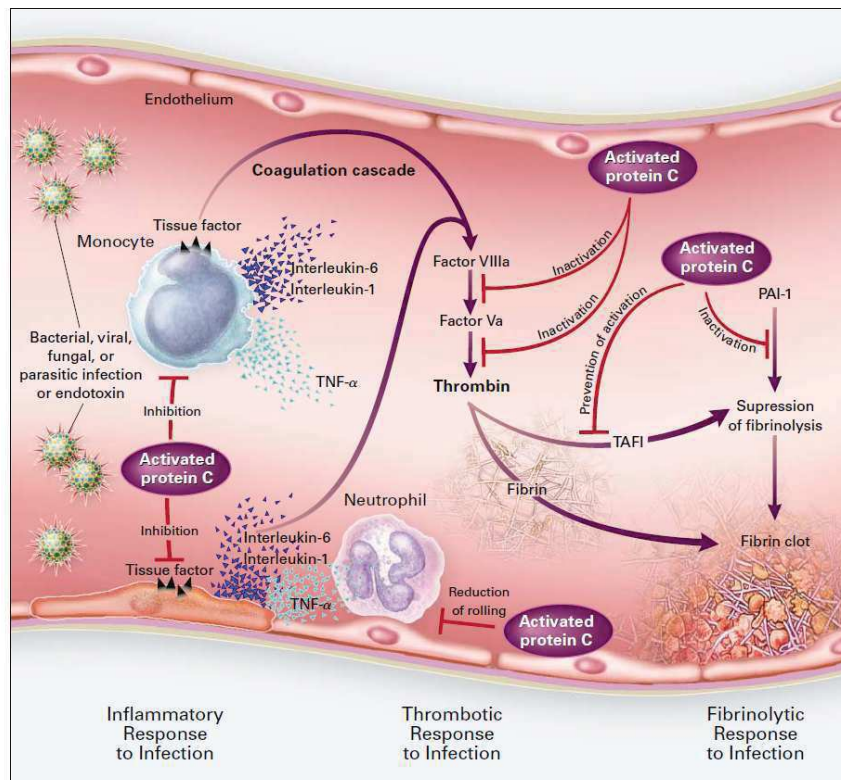


Figure 33 : Mode d'action supposé de la protéine C activée (491)

PAI-1 : plasminogen-activator inhibitor 1, TAFI : thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor

Au final, il est recommandé d'administrer la protéine C activée dans les 24 heures après le diagnostic, uniquement chez les patients les plus sévères (ayant un score de sévérité *Acute physiology and chronic health evaluation* [APACHE] II \geq 25), et ne présentant pas un risque hémorragique majeur (454). Deux essais cliniques sont actuellement en cours chez les patients en choc septique : *Efficacy and Safety of Drotrecogin Alfa [Activated] in Adult Patients with Septic Shock study* (ClinicalTrials.gov number NCT00604214) sponsorisé par l'industrie Eli Lilly qui commercialise la protéine C active humaine recombinante (494) et *Activated Protein C and Corticosteroids for Human Septic Shock* (APROCCHS, ClinicalTrials.gov number NCT00625209) conduit par l'université de Versailles et les hôpitaux de Paris (495).

6.3.2. Corticoïdes à faible dose

Jusque dans les années 1990, les corticoïdes étaient administrés à forte dose chez les patients septiques pour leurs propriétés anti-inflammatoires (496). Après différentes études et méta-analyses, il a été montré qu'un tel traitement n'était pas bénéfique aux patients septiques, et au contraire s'accompagnait d'un risque de décès plus important et d'une tendance à augmenter le risque d'infections secondaires (497).

Actuellement, l'administration des corticoïdes est recommandée à faible dose (200 mg/j d'hydrocortisone) uniquement chez les patients en choc septique qui répondent mal au remplissage vasculaire et à l'administration de molécules vasopressives (498). Le traitement à faible dose a pour but de pallier l'insuffisance surrénalienne qui serait très fréquente chez les patients en choc septique (jusqu'à 60 % des patients atteints) et qui se traduirait soit par une production inadaptée car trop faible de cortisol, soit par une réponse réduite au cortisol (ou résistance tissulaire au cortisol) malgré des concentrations élevées (498, 499). Les corticoïdes à faible dose améliorent la réponse vasculaire aux catécholamines (500, 501) ce qui se traduit au niveau clinique par une durée de choc réduite et un temps de traitement nécessaire par catécholamine plus court (502, 503). Un autre effet bénéfique des corticoïdes à faible dose a été montré dans une étude très récente (randomisée en double aveugle contre placebo) menée chez 150 polytraumatisés : les patients traités présentaient moins fréquemment de pneumonies acquises à l'hôpital par rapport aux patients recevant le placebo (35,6 % versus 51,3 % respectivement) (504). Cependant, en termes d'amélioration de la survie des patients, les résultats restent controversés car n'ayant pas été observés dans toutes les études cliniques (503) (505, 506).

6.4. Correction des désordres immuno-inflammatoires

Les premières thérapeutiques adjuvantes ciblant le système immuno-inflammatoire qui ont été étudiées lors du sepsis avaient pour but de réduire la réponse pro-inflammatoire excessive. Différentes approches ont été testées : des traitements anti-inflammatoires tels que les glucocorticoïdes à forte dose, la neutralisation de composés bactériens, en particulier le LPS des bactéries à Gram négatif, ou de composés endogènes comme les cytokines (507). Ces différentes stratégies ont conduit à des échecs thérapeutiques qui seront détaillés dans le paragraphe suivant.

Compte tenu de la mise en place en parallèle de mécanismes anti-inflammatoires qui aboutissent à une reprogrammation leucocytaire et qui, lorsqu'ils persistent dans le temps, sont associés à un risque accru d'infections nosocomiales et à un mauvais pronostic, la correction pharmacologique de ces mécanismes, notamment par des traitements immunostimulants, constitue un objectif thérapeutique novateur chez ces patients immunodéprimés (508). Un autre avantage de ces thérapeutiques est qu'elles pourraient constituer une solution intéressante pour améliorer l'élimination des pathogènes, en particulier ceux qui sont multirésistants et pour lesquels les alternatives thérapeutiques deviennent de plus en plus limitées (52).

6.4.1. Thérapies immunostimulantes étudiées en clinique

Les trois molécules immunostimulantes qui ont été les plus étudiées jusqu'à maintenant en clinique sont l'IFN- γ , le GM-CSF et le *Granulocyte Colony-Stimulating-Factor* (G-CSF). Elles seront présentées successivement.

6.4.1.1. IFN- γ

L'IFN- γ , principalement produit par les lymphocytes T et les cellules *Natural killer*, joue un rôle majeur dans l'activation de nombreuses fonctions monocytaires essentielles à l'élimination des agents infectieux (ex. : augmentation des propriétés bactéricides vis-à-vis des pathogènes phagocytés, apprêtement et présentation antigénique accrus) (509).

L'IFN- γ est utilisé actuellement en France avec comme indication « la réduction de la fréquence des infections graves chez les patients atteints de granulomatose septique chronique » (extrait du Vidal 2011).

Une première étude menée sur une cohorte de 201 patients traumatisés recevant soit un placebo (n = 99) soit une dose de 100 μ g d'IFN- γ recombinant (n = 102) pendant 10 jours

consécutifs, a montré que ce traitement permettait d'améliorer l'expression monocytaire de HLA-DR. Ceci ne s'est pas traduit par une diminution de la survenue d'infection secondaire ou de la mortalité, mais le nombre de patients inclus était trop faible pour observer un effet significatif (510). Sur le modèle de la première étude, une seconde a été conduite sur une cohorte plus importante de traumatisés avec une administration d'IFN- γ à la même dose pendant 21 jours consécutifs. Le traitement a permis de réduire la mortalité liée à une infection (18 décès [soit 9 %] dans le groupe placebo versus 7 [soit 3 %] dans le groupe traité), mais ce résultat positif est à pondérer du fait que cet évènement clinique a été rajouté rétrospectivement dans l'analyse et que l'effet positif observé était le reflet d'un seul site hospitalier (ayant recruté le plus de patients) (510).

L'IFN- γ pouvant induire des effets délétères lorsqu'il est administré à la phase pro-inflammatoire très précoce du choc (par augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-6) (511), par la suite d'autres études ont été menées avec administration d'IFN- γ aux patients présentant un état d'immunosuppression mesuré par une faible expression de HLA-DR monocytaire (<30 %). Sur la base de ce critère, Döcke *et al.* ont administré de l'IFN- γ à 9 patients (100 μ g par jour) : leur expression monocytaire de HLA-DR a été améliorée aussitôt, de même que la réponse fonctionnelle monocytaire *ex vivo* à du LPS (**Figure 34**). Cliniquement, 8 des 9 patients traités ont rapidement résolu leur atteinte septique (304).

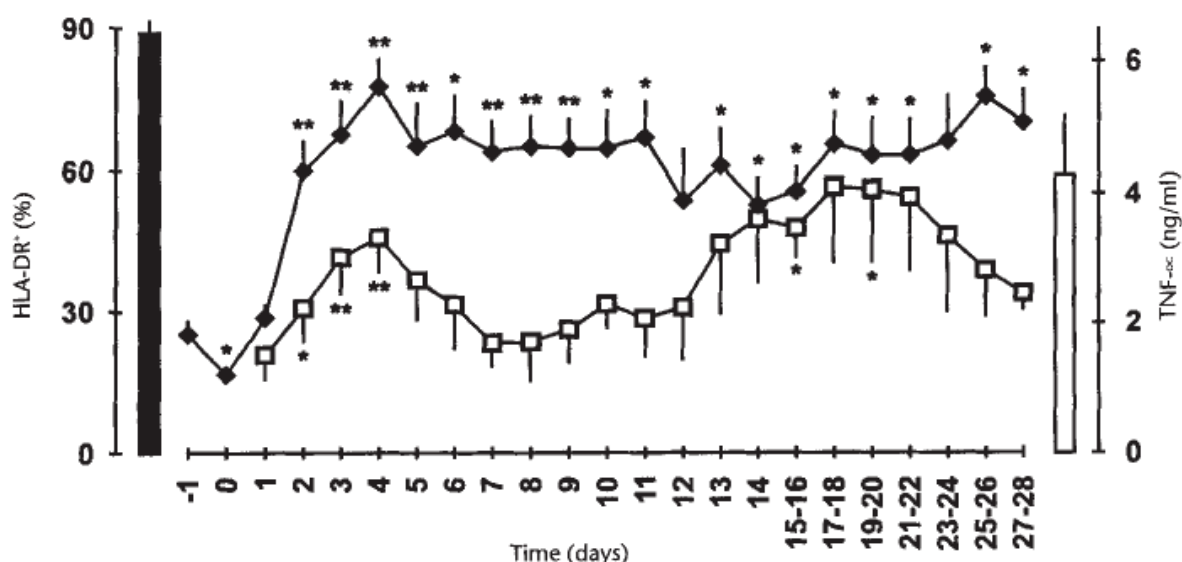


Figure 34 : Amélioration de l'expression de HLA-DRm et de la réponse fonctionnelle des monocytes après administration d'IFN- γ à des patients septiques immunodéprimés (304)

Dans l'étude de Nakos *et al.*, parmi les 21 polytraumatisés ayant une expression de HLA-DR réduite sur leurs macrophages alvéolaires, 10 ont reçu de l'IFN- γ en aérosol et 11 un placebo

pendant 7 jours (100µg trois fois par jour). Trois jours après l'initiation du traitement, les patients recevant l'IFN-γ avaient une expression de HLA-DR améliorée sur leurs macrophages, une augmentation des concentrations en médiateurs pro-inflammatoires (IL-1β, activité de phospholipase A2) et une baisse de concentration en IL-10 dans leur LBA. De plus, l'incidence des pneumopathies induites par la ventilation mécanique était plus faible chez les patients recevant de l'IFN-γ que chez ceux sans traitement (512).

Dans les études précédemment citées, l'IFN-γ semblait être bien toléré par les patients (304, 512).

6.4.1.2. GM-CSF

Dans l'organisme, les principales sources cellulaires de GM-CSF sont les lymphocytes T, les monocytes/macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales (513). *In vivo*, le GM-CSF permet de mobiliser les monocytes et les autres populations myéloïdes depuis la moelle vers la circulation sanguine périphérique (**Figure 35**). *In vitro*, le GM-CSF participe au processus de survie, d'activation, de différenciation et de maturation de différentes cellules leucocytaires (ex. : monocytes/macrophages, PNN ou polynucléaires éosinophiles, cellules dendritiques) (514).

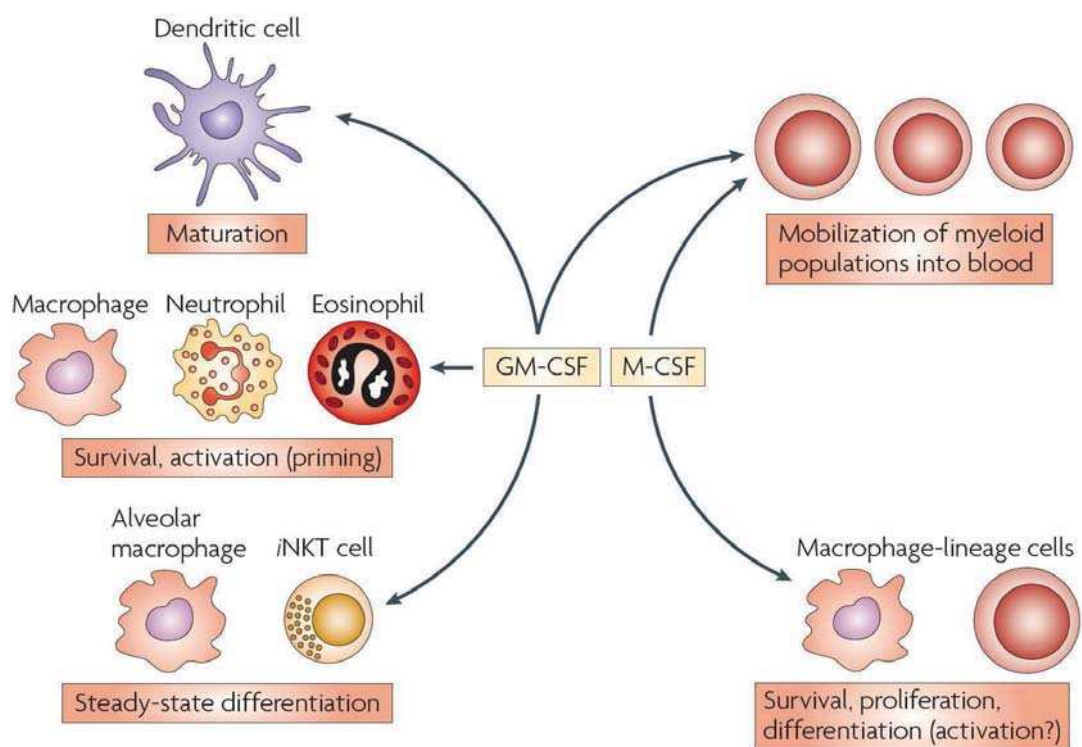


Figure 35 : Effets du GM-CSF sur différentes populations leucocytaires (514)

iNKT : invariant natural killer T

Le GM-CSF n'est plus commercialisé en France, mais est utilisé aux Etats-Unis en clinique afin d'accélérer la récupération des fonctions de la moëlle osseuse après chimiothérapie (fonctions de croissance, de différenciation et de libération de cellules progénitrices hématopoïétiques depuis la moëlle) (513).

De par ses propriétés immunostimulatrices, l'effet du GM-CSF a été évalué dans différentes cohortes de patients présentant des dysfonctions immunitaires. *In vitro*, le GM-CSF permet de restaurer en partie la production leucocytaire de TNF- α en réponse à du LPS dans un modèle en sang total de patients septiques ou polytraumatisés (515). Administré *in vivo* chez des patients en sepsis sévère avec des dysfonctions immunitaires (expression réduite de HLA-DR monocytaire depuis au moins 48 heures, et concentration plasmatique d'IL-6 en décroissance depuis 48 heures), le GM-CSF recombinant humain a pour effet d'accroître le nombre de leucocytes circulants, d'augmenter l'expression de HLA-DR monocytaire et d'améliorer les fonctions leucocytaires (évaluées par la production *ex vivo* de TNF en réponse à du LPS) (306). Des résultats similaires et complémentaires ont été obtenus au cours de l'étude récente menée par Meisel *et al.* incluant 38 patients sur la base d'une expression réduite de HLA-DRm (< 8000 anticorps/monocytes 2 jours de suite). Les 19 patients ayant reçu du GM-CSF ont tous normalisé leur expression de HLA-DRm contre 3 patients sur 19 dans le groupe placebo (**Figure 36A**). Après 5 jours de traitement par le GM-CSF, la production *ex vivo* de TNF- α (**Figure 36B**), d'IL-6 et d'IL-8 était plus élevée chez les patients traités (en réponse à du LPS ou à un agoniste du TLR2), et la production d'IL-10 était réduite par rapport aux patients non traités (305).

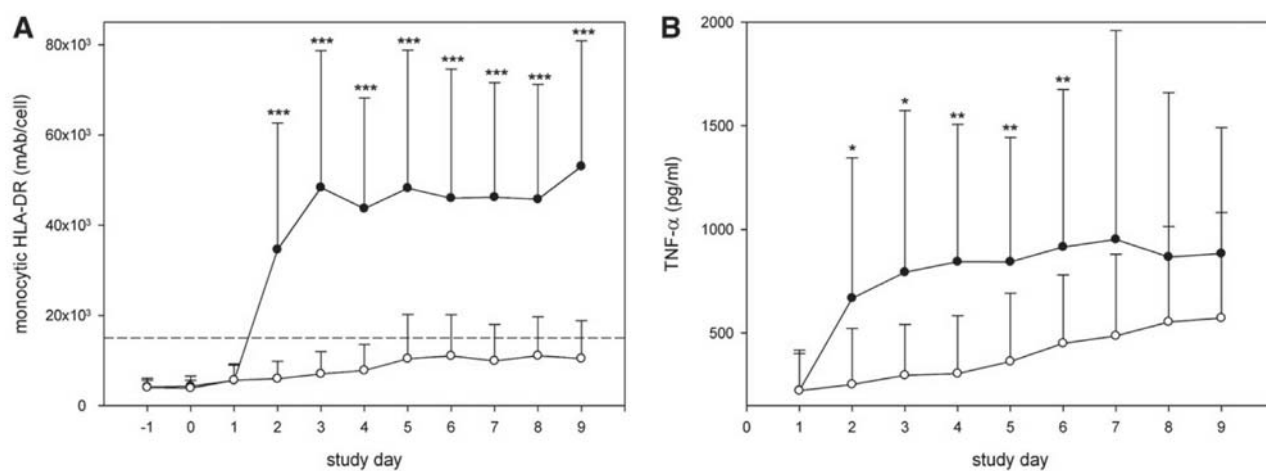


Figure 36 : Expression de (A) HLA-DRm et (B) production monocytaire de TNF- α (*in vitro* en réponse à une stimulation au LPS) chez des patients septiques immunodéprimés recevant du GM-CSF (305)

rond noir : patients recevant du GM-CSF, rond blanc : patients recevant un placebo

Au niveau clinique, l'administration de GM-CSF à des patients septiques réduit la durée de l'antibiothérapie et tend à diminuer la fréquence des complications infectieuses (516). De manière similaire, dans une cohorte de 40 patients septiques, l'augmentation de l'expression de HLA-DRm induite par le GM-CSF a été positivement corrélée à une fréquence de résolution de l'infection plus importante (517). De plus, le traitement par GM-CSF a permis de réduire la sévérité de l'état septique (mesurée par le score APACHE II) (305), les défaillances d'organes (évaluées par une baisse du score *Sequential organ failure assessment* [SOFA]) (518), et de raccourcir la durée d'hospitalisation des patients (305, 516). Cependant, les effets bénéfiques du traitement ne semblent pas avoir de conséquence positive sur la survie des patients. Une méta-analyse récente réalisée à partir de 4 essais cliniques randomisés sur un total de 195 patients septiques n'a pas montré d'effet bénéfique du GM-CSF en termes d'amélioration de la survie. Néanmoins la puissance statistique des essais inclus n'était pas suffisante pour mettre en évidence un tel effet : 3 des essais avaient inclus des cohortes de moins de 50 patients (519).

A l'avenir, le traitement par GM-CSF semblant bien toléré (519), il apparaît nécessaire de mener des études sur des cohortes plus importantes pour être en mesure d'évaluer l'impact du traitement sur la survie des patients (520). De plus, pour améliorer la qualité des essais cliniques, les patients devraient être stratifiés puis monitorés à l'aide de paramètres immunologiques comme l'expression de HLA-DRm (521).

6.4.1.3. G-CSF

Le G-CSF est produit par les monocytes/macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Son expression peut être induite par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-1 (522). Le G-CSF agit principalement sur les PNN. Il augmente le nombre de PNN circulants en stimulant la prolifération de leurs précurseurs et en accélérant leur maturation. Le G-CSF améliore les fonctions des PNN en augmentant notamment leur capacité de phagocytose et de destruction des éléments phagocytés ou en stimulant leur métabolisme oxydatif (522). Les monocytes expriment aussi le récepteur du G-CSF et *in vitro* le G-CSF réduit la libération monocyttaire de cytokines pro-inflammatoires en réponse à du LPS (522).

Le G-CSF est utilisé en France avec par exemple comme indication la « réduction de la durée des neutropénies et de l'incidence des neutropénies fébriles chez les patients traités par une chimiothérapie cytotoxique pour une pathologie maligne (à l'exception des leucémies myéloïdes chroniques et des syndromes myélodysplasiques) », ou dans le « traitement des

neutropénies persistantes chez les patients infectés par le VIH à un stade avancé » (extrait du Vidal 2011).

Dans les modèles pré-cliniques sans neutropénie, le G-CSF s'est avéré efficace en termes d'amélioration de la survie et de la clairance microbienne principalement quand il était administré en préventif, avant l'inoculation microbienne, ou dans les modèles de péritonite polymicrobienne (522). Dans les études cliniques, l'administration de G-CSF deux jours avant puis pendant plusieurs jours après une chirurgie invasive augmente le nombre de PNN circulants et induit d'autres effets bénéfiques au niveau immunitaire. En effet, la réaction pro-inflammatoire post-chirurgicale (évaluée par le dosage de la CRP) est atténuée, de même le nombre de lymphocytes et/ou l'expression de HLA-DRm sont moins diminués. *In vitro*, cela se traduit par une capacité maintenue des monocytes à répondre à une stimulation au LPS avec production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-1ra ; et par une prolifération lymphocytaire accrue en réponse à un mitogène (523). Administré à 380 patients septiques avec atteinte pulmonaire (contre 376 patients recevant un placebo), le G-CSF a induit une augmentation du nombre de leucocytes circulants (524, 525), il semble améliorer la résolution de l'atteinte infectieuse et tendrait à réduire la survenue de complications telles que l'insuffisance rénale aiguë ou l'aggravation du sepsis en choc septique (524). Une méta-analyse récente menée sur 8 essais cliniques randomisés contre placebo (2195 patients au total) a confirmé que le traitement par G-CSF permet d'augmenter la fréquence de résolution des infections (519). Cependant le traitement n'améliore pas la survie des patients traités (519) et ne permet pas de réduire la survenue d'infections nosocomiales (526). Ces résultats négatifs sont à pondérer du fait du nombre relativement faible de patients inclus dans les études et de l'absence de sélection des patients sur la base de paramètres de la défaillance immunitaire (519, 526). De plus, il semblerait que l'effet du G-CSF puisse dépendre de la concentration endogène en G-CSF présente avant l'administration du traitement aux patients ; ce qui constituerait un paramètre supplémentaire à prendre en compte lors des essais cliniques (527). Enfin un effet lié au mécanisme d'action du G-CSF est le risque d'hyperleucocytose. Plusieurs études ont rapporté une augmentation de près de trois fois le nombre de PNN pour les patients traités par G-CSF par rapport aux patients recevant un placebo (523, 524), et une incertitude existe quant au risque d'exacerbation de l'atteinte pulmonaire induite par l'utilisation du G-CSF (522). De ce fait, le G-CSF n'est peut-être pas la molécule à étudier en première ligne chez les patients en choc septique.

6.4.2. Perspectives thérapeutiques

D'autres molécules immunomodulatrices ont été étudiées à un niveau plus expérimental. Dans une revue récente, Opal cite quelques exemples de ces thérapeutiques immunomodulatrices (**Tableau 3**) (528). Nous allons détailler certaines de ces pistes et commencer tout d'abord par les thérapeutiques anti-apoptotiques.

Strategy	Proposed mechanism of action
T _{reg} inhibitors	Block T _{reg} actions and limit release of TGF- β and IL-10
Anti-IL-10 antibody	Block IL-10-induced monocyte deactivation
Anti-PD-1 or anti-BTLA mAb	Block co-inhibitory signals mediated by PD-1, BTLA
MDSC inhibitors	Block MDSC activity that inhibits the innate and the acquired immune responses
CTLA-4 inhibitors	Block the negative co-stimulatory functions of CTLA-4 on T cells
GM-CSF	Up-regulates depressed HLA-DR expression on monocytes
IL-7, IL-15, FLT-3L	Support dendritic and T-cell function and limit lymphocyte apoptosis
Sirt-1 activators	Improve mitochondrial function and number; reduce apoptosis

Tableau 3 : Exemples de molécules pouvant rétablir la fonctionnalité des cellules immunitaires au cours du sepsis dans les modèles expérimentaux (528)

MDSC : monocyte-derived suppressor cells, Sirt-1 : silent information regulator

6.4.2.1. Thérapeutiques anti-apoptotiques

Avec l'amélioration de la compréhension des mécanismes apoptotiques intervenant dans les états septiques, des cibles thérapeutiques potentielles se sont dégagées et ont été testées dans des modèles animaux, en vue d'une utilisation future en clinique (**Tableau 4**) (326).

Strategy	Intervention
Prevent triggering of extrinsic pathway	Blockade of Fas ligand by using Fas fusion protein
Prevent triggering of extrinsic pathway	Prevent Fas expression by using siRNA
Prevent initiation	Anti-CD40 agonist antibodies
Prevent initiation	Treatment with Bcl-2 agonist peptides
Prevent triggering of intrinsic pathway	Antiretroviral protease inhibitors
Prevent execution phase	Anticaspase-8 siRNA
Prevent execution phase	Treatment with caspase inhibitors

Tableau 4 : Approches thérapeutiques permettant de prévenir l'apoptose lymphocytaire au cours du sepsis dans les modèles murins (326)

siRNA : small interfering RNA

Des molécules s'opposant au déclenchement de la voie extrinsèque ont été testées chez l'animal septique telles que des composés empêchant la synthèse de Fas ou de Fas-L, ou la

liaison de Fas avec Fas-L. En effet, il avait été observé que chez les souris déficientes génétiquement en Fas-L, l'induction d'un choc septique dans un modèle de CLP se traduisait par une mortalité moins élevée que chez les souris sauvages. Par la suite, après CLP, des souris recevant une protéine de fusion anti-Fas (jouant le rôle de leurre pour Fas-L) présentaient une amélioration de leur survie par rapport aux autres souris. De plus, cette amélioration était présente quand la protéine de fusion était administrée jusqu'à 12 heures après la CLP, ce qui est compatible avec des conditions cliniques de traitement des patients. Plus récemment, un bénéfice similaire en termes de survie a été observé chez des souris septiques traitées avec des ARN silencieux dirigés contre Fas (et injectés 30 minutes après la CLP) (326).

Des molécules s'opposant au déclenchement de la voie intrinsèque ont aussi été testées, c'est le cas des inhibiteurs de protéases comme nelfinavir ou ritonavir (utilisés dans le traitement du VIH). Il a été supposé initialement que les propriétés anti-apoptotiques de ces composés résultaient de leur capacité à inhiber les caspases, mais plus récemment il a été montré qu'ils permettaient de stabiliser le potentiel de membrane mitochondrial (529). Administrés jusqu'à 4 heures après la CLP, nelfinavir et ritonavir réduisent l'apoptose lymphocytaire et améliorent la survie des souris. Ces deux molécules étant déjà utilisées dans le traitement du VIH chez l'homme, leur administration pourrait être envisagée chez les patients septiques (326).

Une autre stratégie thérapeutique pourrait consister à prévenir l'initiation des mécanismes apoptotiques en induisant l'expression de composés anti-apoptotiques. Dans un modèle de CLP, des souris sur-exprimant la protéine anti-apoptotique BCL-2 au niveau de leurs lymphocytes T étaient protégées des mécanismes apoptotiques (touchant les lymphocytes T). L'effet protecteur de BCL-2 semblait être médié par un maintien du potentiel de membrane mitochondriale. La survie des souris sur-exprimant BCL-2 était significativement améliorée (324). Des résultats similaires en termes de survie ont été décrits après transfert de lymphocytes T sur-exprimant BCL-2 à des souris sauvages rendues septiques (530). Un autre composé réduisant les mécanismes apoptotiques est la sérine/thréonine kinase Akt qui intervient dans la régulation de la prolifération et de la mort cellulaire. Après induction d'un choc septique par CLP, 94 % des souris transgéniques sur-exprimant Akt étaient en vie à 7 jours contre 47 % pour les souris sauvages. Les mécanismes pouvant expliquer l'effet bénéfique de Akt sont la réduction de l'apoptose lymphocytaire induite par le sepsis et une augmentation de la production d'IFN- γ par ces lymphocytes après stimulation (par des anticorps anti-CD3 ou anti-CD28) (531).

L'inhibition de la phase exécutive de l'apoptose via l'utilisation de molécules bloquant les caspases constitue une autre approche thérapeutique possible. L'administration à des souris septiques d'un inhibiteur de caspase à large spectre (z-VAD) après la CLP a permis de réduire l'apoptose lymphocytaire et d'améliorer la survie des animaux (323). La même équipe a évalué l'effet d'un inhibiteur plus sélectif s'opposant à la caspase-3. Ce composé a permis de réduire l'apoptose lymphocytaire des souris septiques, ce qui s'est traduit par une amélioration de l'élimination bactérienne et de la survie des souris septiques (322).

6.4.2.2. anti-IL10

L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire induite au cours du choc septique, constitue une cible intéressante à antagoniser au cours de la phase immunosuppressive du choc, étant donné que de fortes concentrations d'IL-10 sont corrélées à une mortalité plus importante des patients en sepsis sévère ou en choc septique (221, 228, 229). L'ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o') tellurate (AS101) est un composé qui permet d'inhiber l'expression d'IL-10 au niveau transcriptionnel. Administré 12 heures après l'induction d'un choc septique dans un modèle murin de CLP, AS101 induit plusieurs effets bénéfiques à la phase immunosuppressive du choc : il permet de restaurer la capacité des macrophages péritonéaux à produire les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β (*in vitro* après stimulation au LPS), il restaure l'expression des molécules du CMH de classe II de ces macrophages ainsi que la production d'IFN- γ par les splénocytes après une stimulation *in vitro*. Il améliore aussi la clairance bactérienne et la survie des souris traitées (532). Des résultats similaires ont été obtenus avec AS101 dans un modèle murin de CLP suivi 4 jours après la chirurgie par l'induction d'une pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* (533). Un élément important dans ces deux études est que le moment de l'administration d'AS101 par rapport à l'induction du choc était déterminant pour obtenir un effet bénéfique (532, 533). Par exemple dans l'étude de Kalechman *et al.*, seule l'injection d'AS101 12 heures après la CLP améliorait la survie des souris, alors que l'injection 24 heures avant, pendant ou 7 heures après la CLP n'avait pas d'effet (532). Si un traitement équivalent est testé dans un essai clinique, il devra donc être administré après un monitoring des fonctions immunitaires des patients, pour ne traiter que ceux qui en auront besoin.

6.4.2.3. Autres approches expérimentales

6.4.2.3.1. Anti-T régulateur

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont des propriétés immunomodulatrices médiées par plusieurs mécanismes tels que la libération de cytokines anti-inflammatoires (ex. : IL-10 ou TGF- β), la consommation d'IL-2, la cytolysse, l'arrêt du cycle cellulaire des cellules ciblées (via galectin-1) ou certains effets immunomodulateurs sur les cellules dendritiques (ex. : baisse d'expression de CD80 ou CD86, blocage de la maturation cellulaire) (341, 342).

Plusieurs de ces mécanismes ont été la cible de molécules visant à s'opposer à l'effet immunosuppresseur des lymphocytes Treg. C'est le cas par exemple du co-récepteur inhibiteur CTLA-4 exprimé par les Treg (et qui sera détaillé dans le paragraphe suivant). Le récepteur GITR présent à la surface des Treg permet, lorsqu'il est activé, d'inhiber les fonctions suppressives de ces cellules. Dans un modèle de souris septiques (après CLP), l'utilisation d'anticorps agonistes anti-GITR *in vivo* a permis de réduire les propriétés suppressives des Treg *in vitro*, en inhibant notamment la baisse de prolifération des lymphocytes T effecteurs co-cultivés avec les Treg. Les souris septiques traitées par l'agoniste anti-GITR présentaient une résistance accrue à l'induction d'une infection secondaire par *Legionella pneumophila*, ce qui s'est traduit par une augmentation de leur survie (336). En oncologie, les lymphocytes Treg ayant des effets délétères sur l'immunité anti-tumorale, différentes molécules s'opposant au développement ou aux fonctions de ces cellules régulatrices sont en étude de phase II (534). Ces essais témoignent de l'intérêt porté à la recherche de thérapeutiques dirigées contre les Treg.

6.4.2.3.2. Anti-co-récepteur inhibiteur

Comme les co-récepteurs inhibiteurs délivrent des signaux d'inactivation aux lymphocytes, il pourrait être intéressant de les bloquer au cours du sepsis pour améliorer la réponse lymphocytaire. Prenons l'exemple du CTLA-4. Il est exprimé de manière constitutive par les lymphocytes Treg et son expression est induite sur les autres lymphocytes après activation (535). CTLA-4 est impliqué dans les fonctions immunosuppresseuses des lymphocytes Treg comme le montre la baisse des capacités suppressives de ces lymphocytes chez des souris rendues déficientes en l'expression de CTLA-4 (ex. : perte de la capacité des Treg à s'opposer à la prolifération de lymphocytes T effecteurs stimulés par des anti-CD3 et des cellules dendritiques) (535). Dans un modèle de colite sévère induite chez la souris, l'utilisation d'anticorps bloquants anti-CTLA-4 a permis d'annuler efficacement certaines propriétés des lymphocytes Treg comme leur effet suppresseur sur la synthèse d'IFN- γ par les cellules T des ganglions lymphatiques mésentériques (536). En oncologie, l'ipilimumab (anticorps

bloquants anti-CTLA-4) est depuis peu (mars 2011) approuvé par la *Food and Drug Administration* dans le traitement du mélanome inopérable ou métastatique (537). Cet anticorps anti-CLTA-4 fait l'objet de nombreuses études cliniques chez des patients ayant différents types de cancers (pulmonaire, prostatique, lymphome etc.) (537). Néanmoins un facteur limitant important du traitement semble être sa toxicité : de nombreux effets indésirables en lien avec le système immunitaire sont recensés dans les essais cliniques et seraient dus au blocage non spécifique des molécules CTLA-4 à la surface de tout lymphocyte activé, provoquant une activation lymphocytaire incontrôlée (538). Cette toxicité, si elle est confirmée dans les prochains essais thérapeutiques, serait en défaveur d'une possible utilisation de ces anticorps anti-CTLA-4 dans le cadre du sepsis.

Des molécules bloquant le système co-inhibiteur PD-1:PD-L ont été évaluées dans différents modèles d'infections virales chroniques s'accompagnant d'un état d'épuisement lymphocytaire, telles que les infections dues au virus VIH ou responsables des hépatites B ou C. L'utilisation d'anticorps bloquant PD-1 ou ses ligands a permis de restaurer *in vitro* la capacité proliférative et la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2 ou l'IFN- γ de lymphocytes humains spécifiques (400, 401, 403, 406, 420). Une étude a évalué l'intérêt d'administrer des anticorps anti-PD-1 à des souris 24 heures après qu'elles aient subi une CLP (424). Ces anticorps ont permis de réduire l'apoptose des cellules immunitaires de la rate (lymphocytes T et B ou cellules dendritiques) à un niveau similaire à celui observé chez les souris ayant subi une opération sans CLP. Le traitement a aussi permis d'améliorer la production d'IL-6 en réponse à une stimulation par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. De plus les souris septiques avaient une réponse d'hypersensibilité retardée (à l'acide trinitrobenzène sulfonique) identique à celle des souris opérées sans CLP. Enfin, la survie des souris septiques était significativement améliorée par les anticorps anti-PD-1 (**Figure 37**) (424). Sur la base de ces résultats, l'utilisation d'anticorps bloquant la liaison PD-1:PD-L semble constituer une piste thérapeutique intéressante (539).

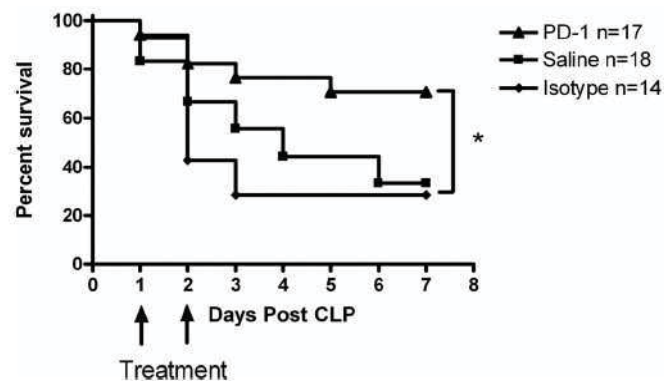


Figure 37 : Amélioration de la survie des souris septiques après administration d'anticorps bloquant PD-1 (424)

6.4.2.3.3. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand

Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) est un facteur de croissance essentiel dans le développement et l'homéostasie des cellules dendritiques. En effet, des souris déficientes en Flt3L ou en son récepteur présentent un développement anormal de leurs cellules dendritiques (540). Chez des patients ayant un sepsis sévère, une forte diminution du nombre des cellules dendritiques (myéloïdes et plasmacytoïdes) est observée à la fois au niveau du sang circulant et de la rate (262, 263) et serait due à une apoptose accrue de ces cellules (264). De plus, les cellules dendritiques présenteraient une capacité moindre d'induction de la prolifération des lymphocytes T, de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 ou IL-12) et une libération accrue d'IL-10 en réponse à une stimulation *ex vivo* (541, 542). Dans un modèle murin d'endotoxine tolérance, il a été montré que l'administration de Flt3L débutée 10 heures après la première injection de LPS permettait d'augmenter le pourcentage des cellules dendritiques au niveau de la rate par rapport aux souris non traitées, ainsi que leur production de TNF- α et d'IL-12 en réponse à une stimulation par du LPS *in vitro* (543). Dans une autre étude chez la souris, l'administration de Flt3L permettait d'augmenter l'expression des molécules de classe II du CMH, de CD86 et de CD40 à la surface des cellules dendritiques, et leur capacité à induire la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ naïfs (par rapport à des souris non traitées) (544). L'administration de Flt3L chez les patients septiques pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante et pourrait notamment augmenter la résistance des patients aux infections secondaires, comme cela a été observé dans un modèle murin d'infection bactérienne induite après brûlure (545).

6.4.2.3.4. Interleukine-7

L'interleukine-7 (IL-7) est une molécule centrale dans la régulation de l'homéostasie et de la survie des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs et mémoires (546). En effet, l'absence du récepteur pour l'IL-7 (IL-7r α) se traduit chez l'homme par un défaut complet en lymphocyte T et par un syndrome d'immunodéficience combinée sévère (547). Dans une étude menée par l'équipe de Hotchkiss, des souris rendues septiques ont reçu de l'IL-7 recombinante humaine (rhIL-7, 90 minutes après la CLP). Cette administration a induit de nombreux effets bénéfiques. Tout d'abord, la rhIL-7 a permis de prévenir la déplétion des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ naïfs ou mémoires centraux notamment par augmentation de l'expression en protéine anti-apoptotique BCL-2, par diminution des molécules pro-apoptotiques comme PUMA, ou par augmentation de la prolifération des lymphocytes T CD8⁺. La rhIL-7 a aussi accru le recrutement des lymphocytes en augmentant l'expression de molécules d'adhésion comme *leukocyte adhesion markers* (LFA-1). Un élément important est que la rhIL-7 a partiellement

restauré la baisse de production d'INF- γ induite par le sepsis sans pour autant exacerber la réponse pro-inflammatoire (la production d'INF- γ n'était pas augmentée chez les souris n'ayant pas subi de CLP). De plus, la rhIL-7 a permis de préserver l'induction d'une réponse d'hypersensibilité retardée chez les souris septiques (**Figure 38**). Tous ces effets bénéfiques se sont traduits par une amélioration significative de la survie des souris septiques traitées (548).

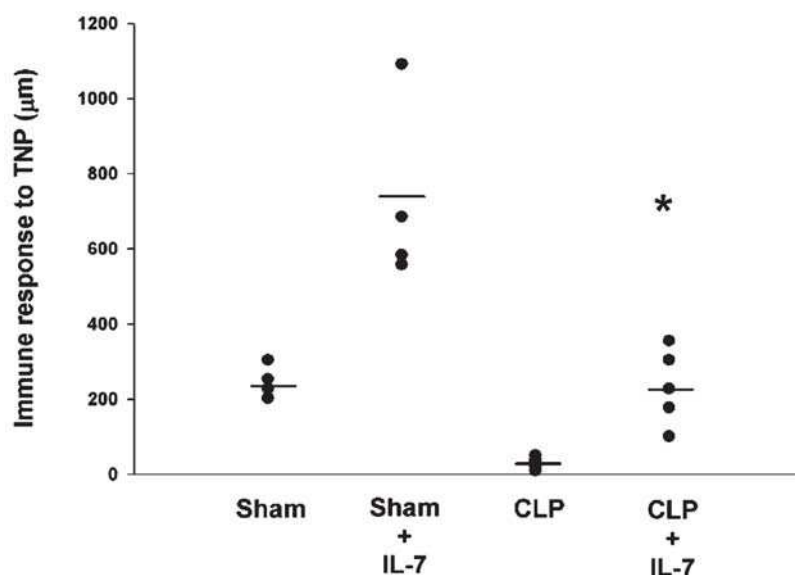


Figure 38 : Restauration d'une réponse d'hypersensibilité retardée au trinitrophenyl (TNP) chez les souris septiques après administration d'IL-7 recombinante humaine (548)

Il est à noter que des études cliniques de phases I ont été conduites avec la rhIL-7 chez des patients ayant des tumeurs réfractaires aux thérapeutiques habituelles ou chez des patients VIH⁺. Le nombre de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ a été augmenté chez ces patients de manière dose-dépendante et ces lymphocytes ont conservé leur fonctionnalité (capacité de réponse conservée à une stimulation *in vitro* par des anticorps agonistes anti-CD3) (549). Deux études de phase I sont actuellement en cours chez des patients ayant une hépatite B ou C chronique (référence respective : NCT01027065 et NCT01025596 sur le site clinical.trials.gov). L'IL-7 qui semble être bien tolérée chez l'homme, est donc une molécule potentiellement intéressante dans le traitement du choc septique (548). Un élément qui semble conforter cette hypothèse est l'observation de concentrations plasmatiques en IL-7 significativement plus élevées chez des enfants survivant à une infection bactérienne sévère par rapport aux non-survivants (même après ajustement sur d'autres paramètres comme l'âge, le nombre de PNN ou le statut VIH des enfants) (550).

7. Vers une individualisation ciblée de la prise en charge des patients

7.1. Les leçons de l'échec thérapeutique des anti-inflammatoires dans le traitement du choc septique

Pendant de nombreuses années, la physiopathologie septique a été considérée comme la résultante d'une réponse pro-inflammatoire excessive. Les thérapeutiques anti-inflammatoires ayant des effets bénéfiques dans les modèles animaux du sepsis, elles ont ensuite été testées chez l'homme. Trois principales stratégies ont été étudiées et seront appréhendées successivement : les traitements anti-inflammatoires (ex. : anti-inflammatoire non stéroïdien et glucocorticoïdes à fortes doses), les molécules neutralisant des composés microbiens (ex. : endotoxine) ou les traitements dirigés contre des médiateurs pro-inflammatoires particuliers (ex. : TNF, interleukines) (551).

Concernant les traitements anti-inflammatoires non stéroïdiens, une étude menée sur une cohorte de 455 patients septiques a montré que l'ibuprofène permettait de réduire la fièvre, la tachycardie, la consommation d'oxygène ainsi que les concentrations plasmatiques en acide lactique. Cependant, ces effets bénéfiques ne se traduisaient ni pas par une baisse de la sévérité de l'atteinte, ni par une amélioration de la survie des patients (552).

Une méta-analyse réalisée par Cronin *et al.* regroupant 9 essais cliniques et évaluant l'intérêt du traitement par les glucocorticoïdes à fortes doses sur un total de 1232 patients septiques n'a pas montré d'effet bénéfique en termes de survie. Au contraire, les résultats étaient même en faveur d'une augmentation de la mortalité des patients traités (497). Cependant, administrés à plus faible dose (non anti-inflammatoire) les glucocorticoïdes pourraient avoir des effets bénéfiques chez les patients en choc septique les plus sévères (553).

Les études s'intéressant aux molécules neutralisant des composés bactériens se sont surtout concentrées sur l'endotoxine. Des anticorps anti-endotoxine naturels sont présents dans le sang circulant et apportent une protection relative lors de l'exposition à l'endotoxine. Un anti-sérum obtenu après immunisation de sujets sains et administré à des patients septiques semblait réduire la mortalité avec un effet plus marqué chez les patients en choc septique (554). Deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'endotoxine ont ensuite été développés mais après évaluation de plusieurs essais cliniques, ils ne permettaient pas de réduire la mortalité et semblaient même avoir des effets délétères chez les patients sans infection à Gram négatif (554). D'autres stratégies de neutralisation ont été étudiées telles que l'administration de *High density lipoprotein* reconstitué ou de protéine *Bactericidal-permeability-increasing* recombinante, mais n'ont pas montré d'effet bénéfique sur la survie

des patients (555). Enfin, une stratégie alternative a été d'évaluer l'administration d'immunoglobulines poolées provenant de donneurs multiples. L'avantage de ces immunoglobulines est qu'elles fournissent une réactivité plus large vis-à-vis de nombreux antigènes (microorganismes et toxines microbiennes). L'administration en intraveineuse de ces immunoglobulines a été testée dans plusieurs études qui étaient pour la plupart non concluantes ou de qualité discutable car le nombre de patients était faible (souvent < 100 patients), les essais n'étaient pas toujours en double aveugle et la méthode de randomisation quelquefois non précisée. Sur la base de ces études plusieurs méta-analyses ont été réalisées (556-558). Bien que les auteurs soient restés prudents, il semble que l'administration d'immunoglobulines G enrichies en immunoglobulines A et M puisse apporter un effet bénéfique en termes de survie. Ces résultats restent à confirmer dans un essai randomisé contre placebo avec une cohorte plus importante de patients (559, 560).

Des traitements bloquant sélectivement un médiateur de la cascade pro-inflammatoire ont été testés (TNF- α , IL-1, molécules d'adhésion, radicaux libres oxygénés etc.). De nombreux essais ont tenté d'inhiber le TNF- α circulant, proposé comme un des médiateurs clés dans la physiopathologie septique. Deux stratégies ont été développées : l'emploi de récepteurs solubles et d'anticorps dirigés contre le TNF- α (561). Concernant les récepteurs solubles au TNF- α , ils constituent une stratégie anti-inflammatoire de l'organisme car ils résultent du clivage des récepteurs présents à la surface membranaire des cellules et sont ainsi libérés dans la circulation sanguine où ils peuvent neutraliser le TNF- α . Il en existe deux types : le type I (55kDa) et le type II (75kDa). Une petite étude menée sur 141 patients septiques et utilisant le récepteur de type II a montré une augmentation de la mortalité des patients traités. Une des hypothèses avancées est que le récepteur soluble a fixé puis relargué le TNF- α induisant ainsi une élévation prolongée de la concentration en TNF- α (561). Une étude de phase II utilisant le récepteur soluble de type I et incluant 498 patients a montré des résultats encourageants en termes d'amélioration de la survie, mais ils n'ont pas été confirmés dans une étude de phase III plus importante (avec 1342 patients) (554). L'utilisation d'anticorps dirigés contre le TNF- α a donné des résultats modestement plus intéressants. Une méta-analyse réalisée sur 10 essais cliniques a montré une réduction significative de 3,5 % de la mortalité chez les patients septiques traités. Dans l'une des études incluses, la mortalité était réduite de manière plus importante (5,8 %) chez les patients ayant une concentration plasmatique en IL-6 supérieure à 1000pg/ml et recevant le traitement anti-TNF- α (554). Cependant actuellement, aucun résultat décisif ne permet d'envisager clairement le blocage du TNF- α comme une thérapeutique adjuvante au sepsis.

L'IL-1ra est un inhibiteur compétitif endogène de l'IL-1 qui se fixe sur son récepteur mais n'induit pas de signal d'activation. Des molécules recombinantes de l'IL-1ra ont été testées dans 3 essais cliniques chez des patients septiques. Au total la mortalité a été réduite de 4,9 % chez les patients traités (562). Cependant le développement clinique de cette molécule n'a pas été poursuivi.

D'autres molécules endogènes de l'inflammation ont été la cible de thérapeutiques inhibitrices. Par exemple, quelques études ont tenté de bloquer l'effet vasodilatateur du NO grâce à des inhibiteurs non-spécifiques (ex. : L-N-monométhyl arginine [L-NMMA]). Ce blocage induisait une augmentation de la pression artérielle et diminuait le recours aux thérapeutiques vasopressives. Par contre ce blocage était aussi associé à une baisse du débit cardiaque et à une augmentation de la pression artérielle pulmonaire (554). Un essai de phase III a été prématurément stoppé à cause d'une augmentation de la mortalité de patients en choc septique traités par un inhibiteur de NO-synthase (N^G-méthyl-L-arginine hydrochloride) (563). Au final, dans une méta-analyse réalisée par Zeni *et al.* regroupant 30 études cliniques testant différentes molécules anti-inflammatoires, avec inclusion de plus de 7000 patients septiques, il a été montré que l'effet bénéfique des traitements anti-inflammatoires, s'il était présent, était très faible en termes de survie. De plus, utilisés à fortes doses, les traitements anti-inflammatoires étaient même délétères (**Tableau 5**) (564).

Thérapeutiques testées	Type d'étude clinique	Critère d'inclusion	Bras contrôle Décès Total (%)	Bras traité Décès Total (%)
IL-1 ra (n=3 études)	Phase II ou III	Sepsis sévère ou choc septique	276/783 (35 %)	346/1115 (31 %)
Anti-bradykinine (n=2 études)	Phase II	SIRS secondaire à une infection présumée	76/210 (36 %)	212/545 (39 %)
Anti-PAF (n=2 études)	Phase III	Sepsis sévère ou choc septique	218/438 (50 %)	196/432 (45 %)
Anti-TNF (n=6)	Phase II ou III	Sepsis sévère ou choc septique	204/563 (36 %)	438/1244 (35 %)
Récepteur soluble du TNF (n=2 études)	Phase II	Sepsis sévère ou choc septique	64/173 (37 %)	154/412 (37 %)
Ibuprofène (n=3 études)	Phase II ou III	Syndrome septique, sepsis sévère ou choc septique	102/258 (40 %)	95/256 (38 %)
<i>Total</i>			940/2423 (39 %)	1440/4004 (36 %)

Tableau 5 : Effet de plusieurs traitements anti-inflammatoires non stéroïdiens sur la mortalité des patients septiques (d'après (564))

Les résultats sont donc décevants en comparaison des résultats expérimentaux très convaincants. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces échecs dont voici quelques exemples :

- manque d'efficacité des molécules testées. Des anticorps anti-endotoxine supposés devoir bloquer l'endotoxine ont été analysés rétrospectivement. Ils ne permettaient pas *in vitro* de neutraliser l'activité de l'endotoxine sur les macrophages (production d'IL-1 et de TNF non diminuée) (565).

- dose de l'agent testé inadaptée. En l'absence de moyen de monitorer l'effet des thérapeutiques immunomodulatrices sur le système immunitaire, il est difficile d'établir des courbes dose-réponse et donc de déduire la dose thérapeutique la plus appropriée. La dose initiale est souvent estimée à partir des modèles pré-cliniques (566).

- défaut de stratification des patients traités. Quand une molécule ayant pour but de neutraliser un médiateur de l'inflammation est testée, seuls les patients ayant des fortes concentrations de ce médiateur devraient être inclus. Par exemple, dans l'étude NORSEPT II évaluant l'intérêt des anticorps anti-TNF- α au cours du choc septique, seuls 40 % des patients avaient des concentrations plasmatiques en TNF- α mesurables au moment de l'inclusion (565). Dans une étude évaluant l'intérêt de l'IL-1ra, les concentrations plasmatiques en IL-1 des patients à l'inclusion n'ont pas été mesurées (567).

- inefficacité des thérapeutiques utilisées seules. Vu la complexité de la pathologie septique, le fait d'agir sur un seul processus mis en jeu dans la défense immunitaire est peut-être insuffisant pour obtenir un effet notoire sur la survie. L'évaluation de combinaisons de molécules agissant sur différents versants du processus septique pourrait être envisagée (568).

- absence de contrôle de l'effet biologique attendu. Il serait intéressant de vérifier par exemple qu'un anticorps neutralisant le TNF- α permette de diminuer efficacement les concentrations sanguines de cette cytokine, avant d'évaluer son effet sur un évènement clinique comme la mortalité (562).

- outil d'évaluation de l'efficacité des thérapeutiques inadapté. Evaluer l'efficacité d'un traitement par rapport à son effet sur la mortalité suppose que la molécule endogène visée a des effets létaux ou qu'elle est impliquée dans un processus qui a des conséquences directes sur la mortalité. Etant donné la complexité de la physiopathologie septique, cet outil d'évaluation est peut-être inadapté (562).

- modèles animaux peu représentatifs de l'expression clinique septique chez l'homme

- population septique très hétérogène

Ces deux derniers items sont détaillés dans les paragraphes suivants.

7.2. Limites des modèles animaux dans l'étude de la physiopathologie septique

La phase pré-clinique est une étape initiale indispensable à tout essai clinique. Elle comprend des études réalisées *in vitro*, chez l'animal ou des modélisations informatiques des systèmes biologiques (569). Dans le cadre du sepsis, des modèles animaux ont été développés afin de pouvoir améliorer notre compréhension de sa physiopathologie complexe. Cependant les résultats issus de ces études chez l'animal ne peuvent pas être extrapolés directement à l'homme car les modèles animaux présentent un certain nombre de limites.

En ce qui concerne l'induction du choc, les premiers modèles utilisés consistaient en l'injection de LPS ou de bactéries aux animaux (en intraveineuse ou dans la cavité abdominale). Cela est peu représentatif de la physiopathologie septique humaine au cours de laquelle l'infection débute au niveau tissulaire et la multiplication bactérienne se déroule sur plusieurs heures ou plusieurs jours. L'endotoxémie « naturelle » mesurée chez l'homme n'est qu'intermittente et a une faible concentration (570). Au contraire, dans les modèles animaux, les doses administrées étaient bien supérieures à celles détectées au niveau plasmatique chez les patients septiques (571), ce qui se traduisait par une forte et brève réponse initiale pro-inflammatoire avec des concentrations importantes de TNF- α , d'IL-1 puis d'IFN- γ circulants. Les animaux mourraient de cet excès de cytokines, ce qui a orienté les recherches sur l'utilisation de thérapeutiques bloquant ces médiateurs (43, 572).

Les animaux utilisés dans les modèles (souris, rat ou babouin) ne sont peut-être pas les plus adaptés car ils sont moins sensibles à l'endotoxine que l'homme. C'est notamment pour cela que des doses très importantes de LPS ou de bactéries étaient injectées chez ces animaux. Par exemple, la dose de LPS induisant 50 % de mortalité chez la souris est de 10 mg/kg, alors que 0,015 mg/kg de LPS sont suffisants pour induire un choc septique chez l'homme (**Tableau 6**) (573). Ces animaux, plus exposés à l'endotoxine que l'homme (fèces présent dans leur environnement, coprophagie) pourraient avoir développé une forme de tolérance à ces composés (574). Il a été montré que le sérum de souris semble contenir des protéines sériques capables de réduire la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à du LPS. En effet, des monocytes humains stimulés par du LPS et mis en présence de sérum de souris, ont une production de TNF- α qui est réduite (de manière concentration dépendante) alors que celle de l'IL-10 ou de l'IL-1ra n'est pas modifiée (573).

Species	Response	LPS dose, mg/kg
Humans	Shock	0.015
Rabbits	LD ₁₀₀	0.02
Sheep	LD ₁₀₀	0.025
Calves	Shock	0.025
Guinea pigs	LD ₅₀	0.75
Hamsters	LD ₅₀	2
Dogs	LD ₅₀	3
Rats	LD ₅₀	7
Mice	LD ₅₀	10
Rhesus monkeys	No deaths	12.5
Chickens	No deaths	50
Turtles/lizards	No deaths	200

Tableau 6 : Dose létale du LPS chez l'homme et dans différentes espèces animales (573)

Les études chez l'animal se sont beaucoup intéressées à la phase précoce du choc notamment parce que dans les modèles utilisés (injection intraveineuse de LPS ou de bactéries, modèle de CLP sévère), le passage du sepsis vers la défaillance multi-organe et donc la mort, se développait très rapidement (quelques heures) (572). De ce fait, les animaux ne survivaient pas assez longtemps pour développer une dépression immunitaire. De plus, le moment de l'infection est contrôlé dans les modèles animaux et certaines thérapeutiques testées ont été administrées avant ou en même temps que l'inoculum (572). Cette démarche n'est pas le reflet de la prise en charge des patients. Chez l'homme, le diagnostic est difficile et posé plus tardivement dans la physiopathologie septique, une fois que les défaillances d'organes et leurs conséquences cliniques apparaissent (en particulier la défaillance cardio-vasculaire) (572). La phase très précoce du choc est donc peu étudiée chez les patients.

A cela s'ajoute le fait que les patients septiques reçoivent des thérapeutiques dès le diagnostic du sepsis alors que l'animal n'est jamais ou rarement traité (en plus de la molécule testée). Ainsi, une molécule peut s'avérer efficace chez une souris septique ne recevant aucune autre thérapeutique, et n'apporter aucun bénéfice thérapeutique supplémentaire aux autres traitements déjà administrés lors de la prise en charge initiale des patients septiques (574).

Un autre élément important qui est difficile à reproduire dans les modèles animaux est la grande hétérogénéité clinique des patients septiques (détaillée dans le paragraphe suivant). En effet, les souris utilisées sont souvent issues de souches identiques, sont de même sexe, de même âge, sont fréquemment de « jeunes » animaux (âgés de quelques mois, ce qui équivaut chez l'homme à un âge de 10-17 ans), et n'ont pas de co-morbidité pré-existante contrairement à la majorité des patients septiques (**Tableau 7**) (569, 571, 572, 574).

Clinical Sepsis	Standard Animal Models
Multitude of genetic variables, variants; nutritional status, extremes of age, immunocompromised states, and underlying diseases	Identical age—usually young and healthy; same genotype, no underlying diseases
Myriad of infecting microorganisms; different sites of infection; often multiple organisms and multiple sites	Usually single organism of high virulence of exceedingly high inocula to cause sepsis in previously healthy animals
Variable but often blunted by sepsis-induced immunosuppression, endotoxin reprogramming, steroids, antibiotics, surgery; usually late phase of established sepsis	Carefully timed to promote maximum impact of intervention
Carefully monitored for prolonged periods and supported were possible	Small animals: minimal to no monitoring or support large animals: monitored for short periods only

Tableau 7 : Discordance entre l'hétérogénéité de la physiopathologie septique en clinique et les modèles animaux standards (569)

Une telle hétérogénéité ne pourra pas être reproduite dans les modèles animaux. Cependant, ces modèles seront plus informatifs s'ils se rapprochent plus de la physiopathologie septique et de la prise en charge chez l'homme. Récemment, des efforts ont été effectués à ce niveau : dans certains modèles, les animaux reçoivent un remplissage vasculaire, des antibiotiques ou des analgésiques (**Tableau 8**) (572, 575).

	Preclinical	Clinical
Hemodynamic monitoring	**	***
Fluid resuscitation	***	***
Mechanical ventilation	*	***
Vasopressors/ionotropes	**	***
Antibiotics	*	***
Sedation	*	**
Analgésia	*	**

Symbols represent the frequency of support in each setting; *occasionally, **sometimes, ***frequently.

Tableau 8 : Fréquence d'utilisation des traitements de suppléance dans les modèles animaux versus la prise en charge clinique (572)

De plus, les modèles de CLP moins sévères sont développés (ex. : mortalité réduite à moins de 40 % 48h après la CLP (424, 576) ou à 30 % 7 jours après la CLP (548)) et permettent donc de s'intéresser à la phase d'immunosuppression du choc septique. Des modèles sont également mis au point avec induction d'une seconde infection après la CLP utilisant des germes à concentration sublétale (577) ou peu pathogènes comme *Listeria pneumophila* (résistance naturelle des souris à cette bactérie) (336) ou *Aspergillus fumigatus* (578), ce qui permet de mimer le développement des infections secondaires chez les patients septiques. Enfin, une meilleure standardisation des études chez l'animal devrait aussi permettre de

faciliter leur interprétation. Lors d'un symposium de la *Shock society* et de l'*International sepsis forum*, il a été proposé qu'une liste de données minimales (qui sont responsables de la variabilité des modèles animaux) soient reportées lors des études de manière à faciliter les comparaisons entre études (**Tableau 9**) (575).

Animals	Species, genetic background, inbred or outbred strain Gender Age Weight Animal handling and housing conditions
Experimental design	Intervention Experimental model Dose of intervention Controls Methods for randomization Blinding
Analytic plan	Primary and secondary endpoints Sample size calculations Intention-to-treat analysis
Cointerventions	Resuscitation Surgery, antibiotics Feeding
Results	Flowchart of included and excluded subjects Primary and secondary endpoints Mortality

Tableau 9 : Proposition de données à reporter dans les études pré- cliniques pour faciliter leur comparaison (575)

7.3. Hétérogénéité des patients septiques

La population septique regroupe des patients très hétérogènes qui présentent des différences à la fois vis-à-vis de l'agent infectieux à l'origine de l'atteinte et au niveau de leurs caractéristiques individuelles propres. Concernant l'agent infectieux, la sévérité de l'atteinte va dépendre du microorganisme responsable, de sa localisation, sa virulence et/ou sa sensibilité aux molécules anti-infectieuses administrées. Pour une même infection, des patients pourront développer une réponse plus ou moins sévère en fonction de leurs comorbidités pré-existantes, de leur terrain génétique, de leur âge ou de leur statut immunitaire (579). Lors des essais cliniques, l'absence de prise en compte de cette hétérogénéité peut conduire à des résultats contradictoires d'une étude à l'autre, et au final à une incapacité à évaluer l'efficacité réelle d'une nouvelle thérapeutique (562). Par exemple, si dans une étude clinique il est montré que la molécule testée n'a pas d'effet bénéfique, cela peut signifier soit une absence totale d'effet, soit un effet bénéfique de cette molécule chez certains patients et un effet délétère chez d'autres (580). Cela a été observé avec la protéine C activée humaine recombinante (rhAPC). Lorsque les données des études cliniques de Bernard *et al.* (incluant des sepsis sévères) et de Abraham *et al.* (incluant des sepsis sévères à faible risque de mortalité) sont poolées, la rhAPC améliore la probabilité de survie de la population totale de

1,4 % seulement. En s'intéressant à une population plus homogène de patients, c'est-à-dire les patients les plus sévères, la rhAPC améliore la probabilité de survie de 7,1 % (580). L'effet thérapeutique bénéfique de la rhAPC n'est donc pas homogène sur l'ensemble de la population septique ; son administration doit donc être ciblée à une certaine catégorie de patients.

De manière similaire, une méta-analyse portant sur 22 essais cliniques testant l'intérêt de traitements anti-inflammatoires au cours du sepsis a montré qu'il existait une relation significative entre le risque de décès et l'efficacité thérapeutique. En effet, le bénéfice thérapeutique était plus important dans les groupes de patients dont la gravité était la plus élevée (581). Ces résultats ont également été observés chez l'animal : les traitements anti-inflammatoires testés avaient une efficacité très importante dans la majorité des modèles car les animaux présentaient un risque de décès bien supérieur à celui des patients généralement recrutés lors des essais cliniques. Au contraire, dans deux études chez l'animal où le risque de mortalité était plus proche de celui observé dans les études cliniques, un effet délétère de ces traitements anti-inflammatoires était montré (581).

Ainsi, le ciblage de la population d'intérêt est nécessaire lors de l'évaluation d'une nouvelle thérapeutique (582). Des critères d'inclusion en lien avec l'effet thérapeutique attendu pourraient être envisagés pour sélectionner les patients ayant le plus de chance de présenter un effet thérapeutique bénéfique. Par exemple, des molécules ayant pour effet de neutraliser le TNF- α pourraient être testées uniquement chez les patients présentant une concentration en TNF- α excessive (562). Au contraire, pour les thérapeutiques immuno-stimulantes, il apparaît judicieux de ne traiter que les patients qui présentent une dépression immunitaire (237).

Un meilleur ciblage de la population d'intérêt requiert une meilleure caractérisation des patients. L'utilisation de marqueurs biologiques renseignant différents aspects de la physiopathologie septique pourrait constituer une solution intéressante. Sur le modèle du système *Tumor Nodes Metastasis* (TNM) utilisé en cancérologie, le modèle PIRO a été proposé en 2001 pour améliorer la stratification des patients septiques (4). Il repose sur quatre items : **P**rédisposition, **I**nfection, **R**éponse de l'hôte et **O**rgane. Brièvement, « prédisposition » concernerait les co-morbidités du patient, l'âge, le sexe ou les polymorphismes génétiques ; « infection » regrouperait les caractéristiques de l'agent infectieux (ex.: nature du pathogène, virulence, charge bactérienne ou virale, production de toxine) ou le site de l'infection ; « réponse de l'hôte » regrouperait les caractéristiques physiologiques (ex.: température, fréquence cardiaque), des marqueurs non spécifiques de l'inflammation (ex. : protéine C réactive, IL-6) ou des marqueurs spécifiques dans le cadre de

thérapeutique particulière (ex. : TNF- α , endotoxine) ; enfin « dysfonction d'organe » regrouperait l'évaluation de ces dysfonctions au niveau de différents organes (582). Des marqueurs biologiques pourraient permettre de renseigner chacun de ces items en complément des données cliniques (**Tableau 10**).

Domain	Measures
Predisposition	Genetic polymorphisms Comorbidities Sex Age Cultural/religious beliefs
Insult	Infection—microbiology, site Intoxication—e.g., endotoxemia Injury Ischemia
Response	Physiologic (e.g., temperature, heart rate) Nonspecific markers of inflammation (e.g., C-reactive protein, procalcitonin, IL-6) Specific measures of therapeutic target (e.g., TNF, endotoxin)
Organ Dysfunction	Physiologic measures of dysfunction Use of specific therapies Biochemical markers of deranged processes (e.g., apoptosis)

Tableau 10 : Exemples de paramètres pouvant être inclus dans le concept du score PIRO (582)

Une étude récente menée sur plus de 7 000 patients présentés aux urgences avec suspicion d'infection, a permis d'évaluer la valeur prédictive de la mortalité hospitalière d'un potentiel modèle PIRO (**Figure 39**). Il a été observé qu'une augmentation de ce score était associée à un risque de mortalité accru. Dans cette étude, le modèle basé principalement sur des marqueurs cliniques était discriminant pour la mortalité, avec une AUC à 0,90 après analyse ROC (583). Le développement du dosage de facteurs génétiques et de biomarqueurs au lit du malade devrait permettre d'améliorer encore la caractérisation des malades (583).

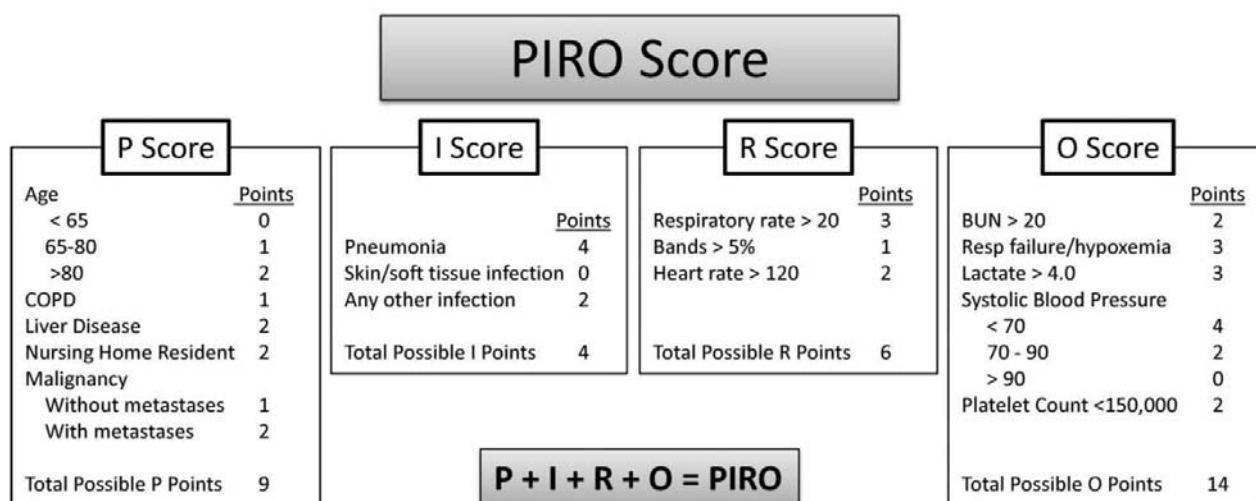


Figure 39 : Exemple d'un potentiel score PIRO (583)

BUN : blood urea nitrogen, COPD : chronic obstructive pulmonary disease

8. Synthèse et présentation du travail personnel

En dépit de nombreux essais thérapeutiques, les syndromes septiques sont la première cause de mortalité en service de soins intensifs. La population septique étant très hétérogène, une meilleure caractérisation des patients serait essentielle afin de mieux individualiser et cibler les thérapeutiques potentiellement bénéfiques. Une approche multiparamétrique de l'utilisation des biomarqueurs est une alternative qui viserait à appréhender la situation de manière plus globale. Notre travail s'inscrit dans ce contexte au travers de l'étude plus spécifique de la défaillance des systèmes cardio-vasculaire et immunitaire.

Nous sommes partis de l'hypothèse de travail qu'un médiateur potentiellement impliqué dans la physiopathologie peut constituer un bon biomarqueur. Concernant la défaillance du système cardio-vasculaire, nous nous sommes intéressés aux variations de pro-hormones cardio-vasculaires (proADM, proANP, proAVP et proET1). Pour ce qui est de la défaillance immunitaire, nous nous sommes intéressés aux molécules du système PD-1.

Si l'objectif initial était d'évaluer ces médiateurs en regard de la mortalité et de la survenue d'infections nosocomiales comme c'est habituellement le cas dans ce type d'étude, nous y avons ajouté des notions additionnelles : (1) un même biomarqueur peut-il apporter une information différente au cours du temps, (2) l'information apportée par l'analyse simultanée de deux biomarqueurs est-elle supérieure à celle de la somme de leurs valeurs individuelles, et (3) l'expression dynamique d'un biomarqueur est-elle meilleure que son expression à un temps donné ? Il s'agit au final d'un travail de recherche translationnelle, alliant recherche clinique observationnelle et approche plus expérimentale en immunologie, autour du rôle des molécules PD-1.

TRAVAUX DE RECHERCHE

INTRODUCTION

Nous présentons successivement 8 articles relatifs à la réalisation de notre projet.

Ils avaient pour objectif d'étudier :

- l'intérêt de 4 pro-hormones cardio-vasculaires en termes de prédiction de la mortalité et/ou des infections nosocomiales chez les patients en choc septique,
- le rôle des molécules du système PD-1 chez les patients en choc septique,
- l'intérêt de différents biomarqueurs liés à l'immunodépression dans différentes situations cliniques rencontrées en réanimation (expression de HLA-DR monocytaire, altérations leucocytaires précoces, marqueurs de l'apoptose ou immunoglobulines sériques).

En parallèle à ces travaux, nous avons participé à la rédaction de deux articles didactiques internationaux sur les altérations lymphocytaires au cours des états septiques et sur l'intérêt de l'utilisation de la cytométrie en flux en service de soins intensifs. Ils sont présentés en annexe de ce manuscrit.

1. Assessment of pro-vasopressin and pro-adrenomedullin as predictors of 28-day mortality in septic shock patients

Caroline Guignant, Nicolas Voirin, Fabienne Venet, Françoise Poitevin, Christophe Malcus, Julien Bohe, Alain Lepape, Guillaume Monneret.

Intensive Care Med, 2009; 35:1859–1867

2. Proatrial natriuretic peptide is a better predictor of 28-day mortality in septic shock patients than proendothelin-1

Caroline Guignant, Fabienne Venet, Nicolas Voirin, Françoise Poitevin, Christophe Malcus, Julien Bohe, Alain Lepape, Guillaume Monneret.

Clin Chem Lab Med 2010; 48(12):1813–1820

La défaillance cardio-vasculaire est une caractéristique précoce de la physiopathologie du choc septique. Dans une volonté de stratification rapide des patients septiques par groupe de sévérité, la recherche de biomarqueurs en lien avec le système cardio-vasculaire semble pertinente. Les précurseurs d'hormones vasoactives MR-proADM, CT-proAVP, MR-proANP et CT-proET-1 ont été précédemment étudiés (souvent séparément) dans des cohortes hétérogènes de patients septiques. Les premiers résultats, obtenus sur des cohortes assez faibles de patients, ont suggéré une corrélation avec la sévérité et la mortalité. L'objectif de notre travail a été d'étudier simultanément ces 4 pro-hormones dans une population exclusivement constituée de patients en choc septique (n=99) au cours de la première semaine après le début du choc et d'évaluer leur valeur prédictive de la mortalité à 28 jours.

Sur la base de nos analyses, à la phase précoce du choc, l'association de deux marqueurs (un marqueur de l'activité vasodilatatrice [pro-ADM] et un marqueur de l'activité vasoconstrictrice [pro-AVP]) a donné les résultats les plus significatifs en analyse multivariée en termes de prédiction du risque de mortalité. Une telle association paraît physiopathologiquement pertinente car reflétant en partie le bilan des forces vasoconstrictrices et vasodilatatrices appliquées au système vasculaire. Plus tardivement, ce sont les précurseurs d'hormones vasodilatatrices (pro-ADM et pro-ANP) qui sont les plus informatifs.

Ces deux études montrent donc l'intérêt d'associer plusieurs biomarqueurs pour améliorer leur apport d'information, et d'analyser des biomarqueurs différents en fonction du temps.

Caroline Guignant
Nicolas Voirin
Fabienne Venet
Françoise Poitevin
Christophe Malcus
Julien Bohé
Alain Lepape
Guillaume Monneret

Assessment of pro-vasopressin and pro-adrenomedullin as predictors of 28-day mortality in septic shock patients

Received: 6 January 2009
Accepted: 12 May 2009
Published online: 7 August 2009
© Springer-Verlag 2009

This article is discussed in the editorial available at: doi:10.1007/s00134-009-1613-2.

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:10.1007/s00134-009-1610-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Guignant · F. Venet · F. Poitevin · C. Malcus · G. Monneret (✉)
Flow Cytometry Unit, Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5, Place d'Arsonval, 69437 Lyon cedex 03, France
e-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr
Tel.: +33-4-72119758
Fax: +33-4-72119753

N. Voirin
INSERM U271, Hospices Civils de Lyon, Hôpital E. Herriot, Service d'Hygiène, Epidémiologie et Prévention, Université de Lyon, Lyon, France

J. Bohé · A. Lepape
Intensive Care Units, Hospices Civils de Lyon, CH Lyon-Sud, Lyon, France

Abstract *Purpose:* Improvements in survival after septic shock will most likely rely on our capacity to manage individualized therapies based on the measurement of rapidly accessible biomarkers. As the early phase of septic shock is dominated by severe alterations of the cardiovascular system, the predictive value for mortality of pro-vasopressin (pro-AVP) and pro-adrenomedullin (pro-ADM), two vasoactive pro-hormones, was assessed. *Methods:* In 99 consecutive patients, pro-hormone concentrations were measured

(immunoluminometric assay) three times within the first week after the onset of septic shock. *Results:* Pro-AVP and pro-ADM concentrations were significantly increased in non-survivors in comparison with survivors and were significantly associated with mortality after both univariate and multivariate analysis. Importantly, when assessed as a pair, pro-ADM and pro-AVP were even more informative. *Conclusions:* Both Pro-ADM and pro-AVP appear to be good biomarkers for the prediction of 28-day mortality after septic shock. However, their association in a single variable tends to improve their predictive capacity.

Keywords Septic shock · Mortality · Prognosis · Adrenomedullin · Vasopressin

Introduction

Septic syndromes remain the leading cause of death in intensive care units. In the United States alone, they develop in 750,000 people annually, of whom more than 210,000 die. Sepsis incidence has been continuously rising over the past 2 decades and is projected to increase significantly in the forthcoming years [1, 2]. Among these syndromes, septic shock possesses the highest severity,

with a mortality ranging from 35 to 50% that has only slightly decreased over years [1, 3, 4].

One likely explanation for the overall only modest gain in survival is that the wide heterogeneity characterizing the septic patient population has not, so far, been appropriately taken into account. Indeed, septic syndromes include a heterogeneous mix of patients presenting with various co-morbidities (along with different long term treatment), different sites of infection

(infected with different germs, more or less virulent), different organ failures, and different pro/anti-inflammatory responses [5, 6]. Thus, improvement in therapeutic interventions and the subsequent rise in survival will likely depend on our capacity to manage individualized therapies for each of these patients. Among tools desirable to achieve this objective, rapid access to biological markers tightly mirroring ongoing mechanisms and/or assessing risk and prognosis is now mandatory [5].

The early phase of septic shock is dominated by severe alterations of the cardiovascular system (ineffective tissue oxygen delivery, inappropriate peripheral vasodilatation, myocardial dysfunctions, altered blood flow distribution) that induce refractory hypotension to volume therapy [7]. In association with the major pro-inflammatory responses occurring within the first hours after septic shock, this likely participates in the development of multiple organ failure [8, 9]. Vasopressin (AVP), produced in the hypothalamus in response to hemodynamic and osmotic stimuli, is a vasopressive hormone that participates in osmoregulation [10]. It has been showed that AVP concentrations are elevated in the initial phase of septic shock, whereas relative AVP deficiency is reported in approximately one-third of late septic shock patients [11]. Adrenomedullin (ADM) is a vasodilator and exhibits natriuretic and diuretic properties [12]. This hormone has been shown to play a pivotal role in initiating the early hyperdynamic response in murine model of sepsis, and elevated levels of plasma ADM have been described early on in septic shock patients [13]. Recently, plasma concentrations of several fragments of precursors of these vasoactive hormones (pro-AVP and pro-ADM) have been reported to correlate with severity in septic patients [14, 15]. Briefly, on admission, concentrations of pro-AVP and pro-ADM were shown to increase gradually in correlation with severity ranging from systemic inflammatory response syndrome (SIRS) to severe forms of sepsis or with the pneumonia severity index (PSI) [14–20].

So far, no data are available for septic shock patients. The objective of this study was therefore to concomitantly assess the value of two precursors of vasoactive hormones (one vasodilator, pro-ADM, and one vasoconstrictor, pro-AVP) as predictors of 28-day mortality during the 1st week following the onset of septic shock.

Patients and methods

Patients

This study was conducted in 99 consecutive patients with septic shock according to the diagnostic criteria of the ACCP/SCCM [21]. A majority (93 out of 99) of these patients had been examined in a previous study for their percentage of HLA-DR expressing monocytes [22]. They

were admitted to the two participating ICUs (one medical, one surgical) of the Lyon-Sud University Hospital (Hospices Civils de Lyon, France). Septic shock was defined by an identifiable site of infection, evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: (1) temperature >38 or $<36^{\circ}\text{C}$; (2) heart rate >90 beats per minute; (3) respiratory rate >20 breaths per minute; (4) white blood cell count $>12,000$ or $<4,000/\text{mm}^3$ and hypotension persisting despite fluid resuscitation and requiring vasopressor therapy. The onset of septic shock was defined by the beginning of vasopressive therapy. The only exclusion criteria were patients younger than 18 years old and the absence of circulating leukocytes. During the follow-up, clinical and biological parameters were collected. The data collection included demographic characteristics (age, gender); admission category (elective or emergency surgery, medicine); referral pattern (community, hospital or ICU-acquired septic shock); microbiological findings (characteristics of the infection such as the source and the identified microorganisms), the delay between the onset of septic shock and the admission in hospital and in ICU (septic shock was considered hospital-acquired when beginning at least 48 h after the admission to hospital); co-morbidities (chronic heart failure, chronic kidney failure, chronic hepatic failure, metastatic cancer, type I diabetes, malignant haemopathy, immunodepressive state or acquired immune deficiency syndrome) and the outcome after 28 days (death or survival). Three clinical scores were recorded: the severity of underlying medical condition according to the criteria of McCabe and Jackson (range 1–3) [23]; the severity at the onset of shock assessed by the Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II, range 0–194) [24]; the sepsis-related organ failure assessment (SOFA, range 0–24) score at day 1–2 and 3–4 after the onset of shock [25].

Pro-hormone measurements were performed on residual blood after completing routine follow-up performed in the ICU, in accordance with the guidelines for clinical research of our institute (which waived the need for informed consent). Arterial blood samples were obtained at days 1–2, 3–4 and 5–7 after the onset of shock (one sample per period). As planned, blood samples were not collected on Saturdays and Sundays, during which time the laboratory did not operate, a fact that accounts for most of the missing values.

Measurements of pro-ADM and pro-AVP

Venous blood samples were collected in tubes containing ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA). After centrifugation, they were kept frozen at -80°C until assayed. Mid-regional pro-ADM and C-terminal pro-AVP were detected with newly developed chemiluminescence sandwich immunoassays, as extensively described

elsewhere [26, 27]. Briefly, each immunoassay employed two polyclonal antibodies targeting specific fragments for each pro-hormone. Tubes were coated with one of these antibodies; the second one (labeled with an akridinium ester) was added to plasma samples (all kits from Brahms, Hennigsdorf, Germany). After incubation, tubes were washed several times with Lumitest wash solution (Brahms), and bound chemiluminescence was measured with a luminometer (Berthold, Germany). Analytical detection limits were 0.08 nmol/l for pro-ADM and 1.7 pmol/l for pro-AVP [26, 27]. In healthy individuals, median concentration for pro-AVP is 4.2 pmol/l [95% confidence interval (CI) 4.0–4.4 pmol/l]. Mean concentration for pro-ADM is 0.33 nmol/l (SD = 0.07) [26, 27].

Statistical analysis

Patients' clinical and biological parameters were described using frequencies, percentages, medians and interquartile ranges (IQR). The two groups of patients (28-day survivors and non-survivors) were compared using Mann–Whitney *U*-test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical data. Predictive value for mortality was evaluated by analysis of receiver-operating characteristic (ROC) curves at days 1–2, 3–4 or 5–7. Survival estimate was based on the Kaplan–Meier method, and comparison of survival distribution was based on the log-rank test. Univariate and multivariate logistic regressions were used to identify the variables associated with the risk of death assessed by odds ratios (OR) and their 95% CI. The variables with a *P* value ≤ 0.15 in univariate analysis were entered in the multivariate model. The parameters included patient gender, age, number of co-morbidities, main diagnosis category, type of infection, site of infection, SAPS II, SOFA and pro-hormone measurements. The continuous variables, such as age, SAPS II and SOFA scores, were categorized using a cutoff value based on the population median. Pro-hormones were stratified using the best threshold indicated by the ROC curves analysis for mortality at day 1–2, 3–4 or 5–7 (i.e., maximized sensitivity and specificity). Pro-hormones were also assessed as a pair leading to four categories: pro-ADM and pro-AVP below their respective optimal thresholds, one above and one below optimal threshold (i.e., two categories) and finally both above thresholds. A *P* value < 0.05 was considered as statistically significant. The analyses were performed using SPSS software (version 12.0, SPSS, Chicago, IL).

Results

Ninety-nine patients with septic shock were included in the study (58 men and 41 women). Median age at

admission was 67 years (IQR 54–76 years). At diagnosis of shock, median SAPS II was 51 (IQR 43–64), and median SOFA score was 10 (IQR 8–12). The overall 28 day-mortality was 35%. At the end of D3, 86 patients were still alive, and 81 were survivors at the end of D5. Demographic, clinical and biological data are presented in Table 1. As usually reported in similar cohorts of patients, SAPS II at admission, SOFA score at day 1–2 and 3–4 and the number of co-morbidities were significantly different between survivors and non-survivors. Parameters related to infection (main diagnosis category, germs, type and site of infection) or demographic characteristics (age and gender) were not different between these two groups. Overall measurements of the two pro-hormones are presented in Fig. 1. Pro-ADM and pro-AVP were significantly higher in non-survivors than in survivors during the whole follow-up.

To evaluate the prognostic value, ROC curve analysis was performed for each pro-hormone at different time points (Table 2). At day 1–2, pro-AVP and pro-ADM presented with an area under the curve (AUC) of 0.76 and 0.71, respectively. At day 3–4, pro-AVP presented with a higher AUC (0.79) than pro-ADM (0.70). Finally, at day 5–7, pro-ADM exhibited the highest AUC (0.86 vs. 0.72 for pro-AVP). On the basis of optimal thresholds (determined according to ROC curve analysis, data not shown), prognostic parameters (PPV, NPV, LR+, LR–) were also calculated for the two pro-hormones (Table 3) indicating that pro-AVP and pro-ADM exhibit significant predictive value for mortality after septic shock.

The predictive capacity of the two pro-hormones was then tested after adjustment for other confounders in a multivariate logistic regression analysis. After univariate analysis, only SAPS II, co-morbidities, SOFA score and pro-hormones were included in the model (*P* ≤ 0.15 , data not shown).

Pro-hormones were tested either independently (i.e., tested one by one with clinical variables) or concurrently (i.e., tested simultaneously as two distinct variables). When tested independently, in association with SAPS II score at day 1–2 and the number of comorbidities at day 3–4, only pro-AVP remained independently associated with mortality (OR_{D1–2} = 3.28; 95% CI 1.02–10.49; *P* = 0.046; OR_{D3–4} = 6.70; 95% CI 1.37–32.79; *P* = 0.019). At day 5–7, each pro-hormone entered in the model independently showed good prognostic value (pro-ADM: OR = 20.11; 95% CI 4.29–94.19; *P* < 0.001, pro-AVP OR = 5.18; 95% CI 1.49–17.98; *P* = 0.010).

When tested concurrently, at day 3–4 (Table 4), only pro-AVP appeared as an independent predictor of mortality (OR = 7.61; 95% CI 1.30–44.44; *P* = 0.024). At day 5–7 (Table 4), only pro-ADM remained significantly associated with fatal outcome (OR = 15.35; 95% CI 3.16–74.57; *P* = 0.001).

Interestingly, when both pro-hormones were expressed as a pair (both above their respective cutoff ratio), this

Table 1 Demographic, clinical and biological data for septic shock patients

Parameters	Survivors <i>n</i> = 64 (65%)	Non-survivors <i>n</i> = 35 (35%)	<i>P</i> -value	Overall population <i>n</i> = 99
Demographic characteristics				
Age at admission (years)	67 (53–75)	70 (55–78)	0.228	67 (54–76)
Gender				
Male sex, <i>n</i> (%)	39 (60.9)	19 (54.3)	0.531	58 (58.6)
SAPS II at diagnosis of shock	49 (41–55)	66 (56–75)	<0.001	51 (43–64)
SOFA score				
1. SOFA D1–D2	9 (8–12)	12 (10–14)	0.002	10 (8–12)
2. SOFA D3–D4	9 (6–11)	14 (10–17)	<0.001	10 (7–13)
Number of co-morbidities				
0, <i>n</i> (%)	42 (65.6)	15 (42.9)	0.035	57 (57.6)
≥1, <i>n</i> (%)	22 (34.4)	20 (57.1)		42 (42.4)
MacCabe score				
1, <i>n</i> (%)	46 (71.9)	25 (71.4)	0.355	71 (71.7)
2, <i>n</i> (%)	14 (21.9)	5 (14.3)		19 (19.2)
3, <i>n</i> (%)	4 (6.3)	5 (14.3)		9 (9.1)
Delay shock—ICU (days)	0 (0–1)	0 (0–1)	0.663	0 (0–1)
Length of ICU stay	12 (8–29)	5 (2–13)	<0.001	11 (5–23)
Rate of intubation in patients, <i>n</i> (%)	54 (84.4)	35 (100)	0.024	89 (89.9)
Length of intubation	10 (4–22)	4 (2–11)	0.001	7.5 (3–19)
Main diagnosis category				
Medical, <i>n</i> (%)	30 (46.9)	20 (57.1)	0.402	50 (50.5)
Surgery, <i>n</i> (%)	34 (53.1)	15 (42.9)		49 (49.5)
Clinical and biological characteristics				
Catecholamine (D1–2)				
Epinephrine (E) or norepinephrine (NE), <i>n</i> (%)	27 (42.9)	13 (38.2)	0.829	40 (41.2)
Dobutamine, <i>n</i> (%)	6 (9.5)	2 (5.9)	0.709	8 (8.2)
E or NE and dobutamine, <i>n</i> (%)	30 (47.6)	19 (55.9)	0.525	49 (50.5)
Dosages of E or NE (µg/kg/min)	0.51 (0.33–0.87)	1.16 (0.61–1.89)	0.001	0.60 (0.36–1.31)
Infection (<i>n</i>, %)				
Diagnosis				
Radiology				
Surgery	6 (9.4)	2 (5.7)	0.917	8 (8.1)
Microbiologically documented				
Bacilli gram–	50 (78.1)	29 (82.9)		79 (79.8)
Cocci gram–	32 (64.0)	16 (55.2)	0.480	48 (60.8)
Cocci gram+	27 (54.0)	15 (51.7)	0.999	42 (53.2)
Fungi	13 (26.0)	12 (41.4)	0.210	25 (31.6)
Others	7 (14.0)	5 (17.2)	0.751	12 (15.2)
Type of infection				
Community acquired	28 (43.8)	20 (57.1)	0.215	48 (48.5)
Nosocomial	36 (56.2)	15 (42.9)		51 (51.5)
In hospital	35 (97.2)	14 (93.3)		49 (96.1)
In ICU	1 (2.8)	1 (6.7)		2 (3.9)
Site of infection				
Pulmonary	25 (39.1)	17 (48.6)	0.565	42 (42.4)
Abdominal	27 (42.2)	14 (40.0)		41 (41.4)
Others	12 (18.8)	4 (11.4)		16 (16.2)

Values are presented as median and IQR in brackets for continuous variables or as number of case and percentages for categorical data. *P* values from Mann–Whitney *U*-test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical data

D Day, *ICU* intensive care unit, *IQR* interquartile ranges, *SAPS II* Simplified Acute Physiology Score II, *SOFA* Sepsis-related organ failure assessment

appeared as the best predictor for mortality at day 1–2 (OR = 5.50; 95% CI 1.23–24.68; *P* = 0.026) and day 5–7 (OR = 46.30; 95% CI 6.09–352.11; *P* < 0.001). This is also illustrated by survival curves after Kaplan–Meier analysis (Fig. 2).

Finally, the influence of renal parameters and catecholamine treatment on the predictive value of both pro-hormones was evaluated, especially since maximal

catecholamine dosages and creatinemia (measured within day 1–2 and day 3–4) presented with a *P* value <0.15 after univariate analysis. As creatinemia and maximal catecholamine dosages are already included in the calculation of the SOFA score, they were not added to the initial multivariate model. However, in a separate multivariate analysis including the SAPS II score, creatinemia, catecholamine dosages, number of co-morbidities

Fig. 1 Measurements of pro-ADM and pro-AVP in survivors and non-survivors at day 1–2, 3–4 and 5–7 after septic shock. Results are presented as box plots and individual values. White boxes represent survivors and grey boxes nonsurvivors. Numbers of samples are as follows: day 1–2 = 75 samples (50 S + 25 NS); day 3–4 = 71 samples (52 S + 19 NS); day 5–7 = 77 samples (59 S + 18NS). **P* value <0.05, ***P* value ≤0.01 (Mann–Whitney *U*-test, corrected by the number of tests)

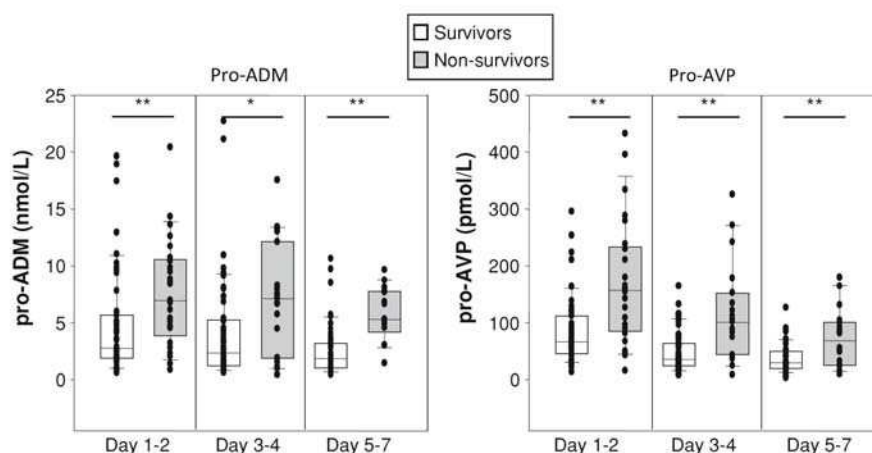


Table 2 ROC curve analysis of pro-ADM and pro-AVP measurements within the first week after septic shock

	Parameters	Area under curve	<i>P</i> -value	95% confidence interval	
				Lower limit	Upper limit
Day 1–2	Pro-ADM	0.710	0.003	0.584	0.835
	Pro-AVP	0.761	<0.001	0.637	0.885
Day 3–4	Pro-ADM	0.696	0.012	0.546	0.847
	Pro-AVP	0.786	<0.001	0.653	0.920
Day 5–7	Pro-ADM	0.861	<0.001	0.769	0.953
	Pro-AVP	0.721	0.005	0.569	0.874

Number of samples: day 1–2 = 75 samples (50 S + 25 NS); day 3–4 = 71 samples (52 S + 19 NS); day 5–7 = 77 samples (59 S + 18NS)

NS Nonsurvivors, S survivors

and both pro-hormones (expressed concurrently or as categories), both pro-hormones kept an independent prognostic value (Table S1). Thus, the increase in pro-AVP and pro-ADM observed after septic shock is most likely not solely due to an altered renal function or high catecholamine dosages in these patients.

Discussion

It has been suggested that early and adequate prognosis and risk assessment after septic shock may facilitate improved care of the patients through tailored therapy [5, 6]. In this context, since the first hours after the onset of shock are dominated by alterations of the cardiovascular system (especially major peripheral vasodilation [7–9]), the measurement of biomarkers (vasodilator/vasoconstrictor) playing a role in the homeostasis of this system (or reflecting its alterations) may be of major interest.

Because vasoactive hormones, in contrast with their precursors, are rapidly cleared from the circulation (half-life of some hours for pro-ADM and days for pro-AVP vs. a few minutes for active hormones) [10, 12, 26, 27], their plasmatic measurement is technically difficult. As generation of both hormone and precursor is a stoichiometric process, the measurement of pro-hormone fragments offers a seducing alternative for assessing the release of vasoactive hormones.

To date, few data are available regarding the potential of vasoactive pro-hormones as biomarkers in septic shock patients. Studies measuring these pro-hormones in

Table 3 Prognostic performances of pro-ADM and pro-AVP

	Optimal cutoff values	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	Likelihood ratio +	Likelihood ratio –
Day 1–2	Pro-ADM > 5 nmol/L	0.68	0.70	0.53	0.81	2.27	0.46
	Pro-AVP > 110 pmol/L	0.64	0.74	0.55	0.80	2.46	0.49
Day 3–4	Pro-ADM > 5 nmol/L	0.68	0.73	0.48	0.86	2.54	0.43
	Pro-AVP > 70 pmol/L	0.74	0.79	0.56	0.89	3.48	0.33
Day 5–7	Pro-ADM > 4 nmol/L	0.78	0.83	0.58	0.92	4.59	0.27
	Pro-AVP > 44 pmol/L	0.67	0.73	0.43	0.88	2.46	0.46

Positive predictive value measures the percentage of death when the value is > optimal threshold; negative predictive value the percentage of survival when the value is ≤ optimal threshold

Table 4 Multivariate logistic regression analysis of pro-hormone measurements at day 1–2, 3–4 and 5–7 after the onset of shock

	Parameters	OR	CI 95%		p value		
			Lower limit	Upper limit			
Day 1-2	Pro-ADM & pro-AVP concurrently	SAPS II ≤ 51	1.00	-	-	-	
		SAPS II > 51	3.44	0.92	12.92	0.067	
		SOFA score ≤ 10	1.00	-	-	-	
		SOFA score > 10	2.38	0.64	8.86	0.196	
		Number of co-morbidities 0	1.00	-	-	-	
		Number of co-morbidities ≥ 1	2.36	0.72	7.79	0.157	
	Pro-ADM & pro-AVP as categories	Pro-ADM ≤ 5	1.00	-	-	-	
		Pro-ADM > 5	2.16	0.60	7.74	0.237	
		Pro-AVP ≤ 110	1.00	-	-	-	
		Pro-AVP > 110	2.46	0.70	8.71	0.162	
		SAPS II ≤ 51	1.00	-	-	-	
		SAPS II > 51	3.71	0.95	14.49	0.060	
	Day 3-4	Pro-ADM & pro-AVP concurrently	SOFA score ≤ 10	1.00	-	-	-
			SOFA score > 10	2.37	0.62	9.10	0.209
Number of co-morbidities 0			1.00	-	-	-	
Number of co-morbidities ≥ 1			2.40	0.71	8.06	0.158	
Pro-ADM ≤ 5 & pro-AVP ≤ 110			1.00	-	-	-	
Pro-ADM > 5 & pro-AVP ≤ 110			4.44	0.78	25.15	0.092	
Pro-ADM ≤ 5 & pro-AVP > 110		6.12	0.89	42.23	0.066		
Pro-ADM > 5 & pro-AVP > 110		5.50	1.23	24.68	0.026		
Day 5-7	Pro-ADM & pro-AVP concurrently	SAPS II ≤ 51	1.00	-	-	-	
		SAPS II > 51	5.15	0.59	44.75	0.137	
		SOFA score ≤ 10	1.00	-	-	-	
		SOFA score > 10	0.96	0.16	5.65	0.967	
		Number of co-morbidities 0	1.00	-	-	-	
		Number of co-morbidities ≥ 1	5.33	1.00	28.38	0.050	
	Pro-ADM & pro-AVP as categories	Pro-ADM ≤ 5	1.00	-	-	-	
		Pro-ADM > 5	0.69	0.08	6.20	0.739	
Pro-AVP ≤ 70		1.00	-	-	-		
Pro-AVP > 70		7.61	1.30	44.44	0.024		
SAPS II ≤ 51		1.00	-	-	-		
SAPS II > 51		5.29	0.60	46.69	0.134		
Day 1-2	Pro-ADM & pro-AVP concurrently	SOFA score ≤ 10	1.00	-	-	-	
		SOFA score > 10	1.00	0.17	5.96	0.998	
		Number of co-morbidities 0	1.00	-	-	-	
		Number of co-morbidities ≥ 1	5.19	0.98	27.58	0.053	
		Pro-ADM ≤ 5 & pro-AVP ≤ 70	1.00	-	-	-	
		Pro-ADM > 5 & pro-AVP ≤ 70	0.96	0.05	18.21	0.977	
	Pro-ADM ≤ 5 & pro-AVP > 70	9.51	1.00	90.92	0.050		
	Pro-ADM > 5 & pro-AVP > 70	5.08	0.60	42.69	0.135		
Day 3-4	Pro-ADM & pro-AVP concurrently	SAPS II ≤ 51	1.00	-	-	-	
		SAPS II > 51	2.28	0.49	10.62	0.296	
		Number of co-morbidities 0	1.00	-	-	-	
		Number of co-morbidities ≥ 1	7.62	1.53	38.06	0.013	
		Pro-ADM ≤ 4	1.00	-	-	-	
		Pro-ADM > 4	15.35	3.16	74.57	0.001	
	Pro-ADM & pro-AVP as categories	Pro-AVP ≤ 44	1.00	-	-	-	
		Pro-AVP > 44	3.04	0.73	12.72	0.128	
SAPS II ≤ 51		1.00	-	-	-		
SAPS II > 51		2.29	0.48	10.87	0.297		
Number of co-morbidities 0		1.00	-	-	-		
Number of co-morbidities ≥ 1		7.65	1.52	38.64	0.014		
Day 5-7	Pro-ADM & pro-AVP concurrently	Pro-ADM ≤ 4 & pro-AVP ≤ 44	1.00	-	-	-	
		Pro-ADM > 4 & pro-AVP ≤ 44	14.71	1.65	131.41	0.016	
		Pro-ADM ≤ 4 & pro-AVP > 44	2.90	0.33	25.90	0.340	
		Pro-ADM > 4 & pro-AVP > 44	46.30	6.09	352.11	< 0.001	

Cut-off for SAPS II and SOFA scores were determined as the median value for the overall population of patients. Optimal threshold for pro-ADM and pro-AVP were chosen according to ROC curve analysis in order to maximize sensibility and sensitivity (from Table 3). Concentrations of pro-ADM and pro-AVP are expressed in nmol/L and pmol/L, respectively

CI Confidence interval, OR odds ratio, SAPS II Simplified Acute Physiology Score II, SOFA sepsis-related organ failure assessment
Significance for bold values is $P \leq 0.05$

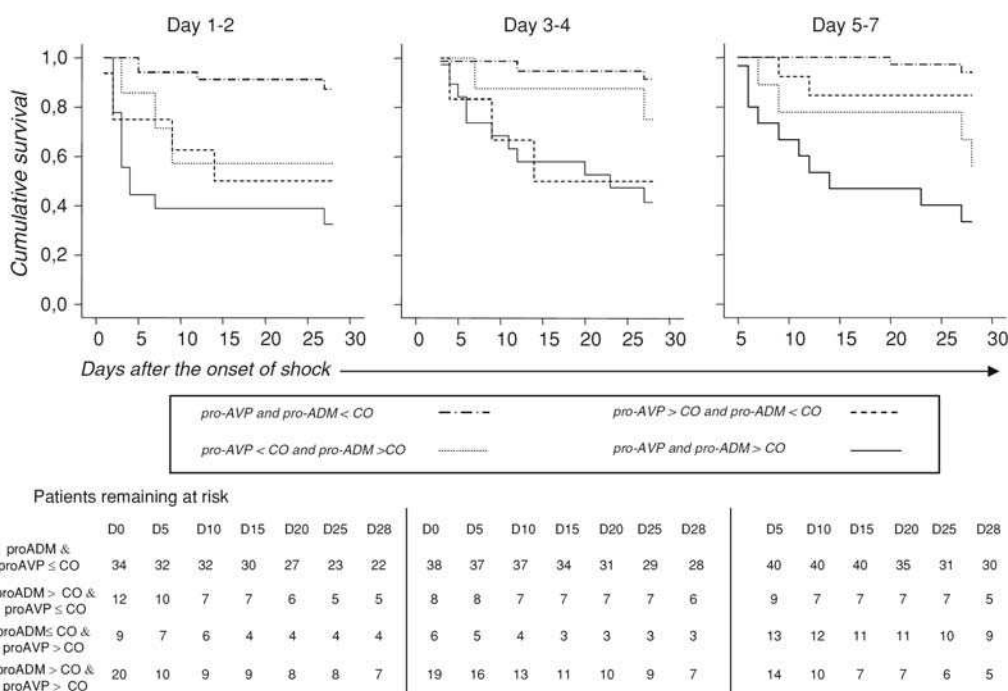


Fig. 2 Kaplan–Meier survival curves stratified according to pro-ADM and pro-AVP measurements considered as a pair at day 1–2, 3–4 and 5–7 after the onset of septic shock. For each time point, log rank test revealed a *P* value <0.001. CO: respective cutoff as provided in Table 3

patients with pneumonia have only included a small number of patients and have mainly considered one pro-hormone at a time [14–17]. For example, in the work of Seligman et al. [16], as observed in our study, pro-AVP remained significantly associated with mortality after multivariate analysis. Concerning pro-ADM, two studies have reported its good prognostic value in critically ill patients [15] and in patients with community-acquired pneumonia [17]. AUCs were calculated at 0.81 and 0.76, respectively, with cutoff values of 3.9 and 1.8 nmol/l, in keeping with the present results (AUC 0.71, 0.70, 0.86; thresholds 5, 5, 4 nmol/l for the three time points).

Beyond this first step of analysis, we further investigated the potential of pro-AVP and pro-ADM to remain independently predictive for mortality in a multivariate analysis. At day 1–2, we observed that along with SAPS II, pro-AVP remained independently associated with mortality as well as pro-AVP and pro-ADM when assessed as a pair and above their respective cut-off ratio. At day 3–4, after adjustment for clinical confounders and pro-ADM, pro-AVP was the sole parameter predictive for fatal outcome. Later on, at day 5–7, along with the number of co-morbidities, pro-ADM was independently associated with mortality as well as its combination with pro-AVP. Of note, the interest of combining pro-hormone measurements in a single parameter has been reported in

another study in which pro-endothelin-1 (pro-ET-1, precursor of the vasopressive hormone endothelin-1) and pro-ADM were assessed as a ratio in 30 septic shock patients. In this study, AUC was improved from 0.49 for pro-ET-1 alone and 0.76 for pro-ADM alone to 0.81 for the ratio [28]. The optimized information provided by the use of combined pro-hormone measurements is also clearly illustrated by survival curves in our study (Fig. 2). The risk of death was higher when both markers were found to be above their respective cutoff ratio. Importantly, at day 1–2, this tended to indicate an early risk of death, as most patients in this group died within the first days after the onset of shock. This could be of major interest if we are to perform an aggressive management of this particular subgroup of patients. Noteworthy, in accordance with our study, it has been shown that in post-acute myocardial infarction the association of pro-hormones as a pair provided additional prognostic information regarding the occurrence of death or delayed heart failure [29–31].

Another interesting result is that pro-hormone measurements provide different information depending on their sampling time after the onset of shock. Pro-AVP showed a better predictive capacity when measured at day 1–2 and 3–4, whereas at day 5–7, pro-ADM was clearly a better predictor. In the early phase of septic shock,

pro-AVP may be more informative as it reflects the counter-regulatory vasoactive response activated in response to the early loss of vascular tone and decreased arterial pressure. As pathophysiology evolves over time, choice and interest of biomarkers may evolve too. Therefore, this supports the importance of the measurement of a panel of biomarkers over time rather than a single one.

Our study has some limitations. This preliminary study was not specifically designed to correlate cardiovascular parameters to the present biomarkers. Our results therefore need to be confirmed in future prospective studies collecting renal and hemodynamic parameters in addition with pro-hormone measurements. Similarly, vasoactive therapies such low dose of corticoids administered during septic shock were not taken into account, although we may hypothesize that these drugs may have influenced pro-hormone release by modulating blood pressure [32]. Besides, 14 values are missing for non-survivors, and 10 values are missing for survivors at D1–2. This was expected as blood samples were not collected on Saturdays and Sundays when the laboratory did not operate (also explaining the 48-h interval regarding the blood sampling). However, since as many non-surviving as surviving patients values are missing, we believe this cannot bias the results. Finally, though a population of 99 septic shock patients constitutes a rather large cohort regarding this specific condition, we can suspect that our

multivariate statistical analysis may have been underpowered, leading to large 95% CIs, especially when pro-AVP and pro-ADM were concomitantly assessed in the model (and even more if we excluded the patients with missing values).

Conclusion

The present work illustrates the potential of combining measurements of different biomarkers in a single parameter and suggests that choice of biomarkers for monitoring patients may also evolve over time. The promising potential of pro-ADM and pro-AVP to guide clinical decisions during initial management of septic shock patients now needs to be investigated in an appropriately designed multicentered study.

Acknowledgments This work was supported by the Hospices Civils de Lyon and was conducted thanks to the support of Brahms—we especially thank Dr. N.G. Morgenthaler and Dr. A. Bergmann. All measurements were performed in the Research Department of Brahms AG in a totally blinded fashion without knowledge of clinical parameters. This work was also conducted thanks to the logistical support (H. Thizy, F. Gueyffier) from the Centre d'Investigation Clinique (CIC 201) de Lyon (Clinical Research Centre) of INSERM and Hospices Civils de Lyon.

References

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 9:1303–1310
2. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL (2007) Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 35:1244–1250
3. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63–78
4. Hotchkiss RS, Karl IE (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J M* 348:138–150
5. Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal SM, Masur H (2008) Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit Care Med* 36:964–966
6. Marshall JC (2008) Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *J Leukoc Biol* 83:471–482
7. Hollenberg SM, Ahrens TS, Annane D, Astiz ME, Chalfin DB, Dasta JF, Heard SO, Martin C, Napolitano LM, Susla GM, Totaro R, Vincent JL, Zanotti-Cavazzoni S (2004) Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Crit Care Med* 32:1928–1948
8. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Sarma JV, Ward PA (2008) Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med* 14:327–336
9. Matsuda N, Hattori Y (2007) Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 43:117–137
10. Treschan TA, Peters J (2006) The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology* 105:599–612
11. Sharshar T, Blanchard A, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D (2003) Circulating vasopressin levels in septic shock. *Crit Care Med* 31:1752–1758
12. Hinson JP, Kapas S, Smith DM (2000) Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev* 21:138–167
13. Zudaire E, Portal-Núñez S, Cuttitta F (2006) The central role of adrenomedullin in host defense. *J Leukoc Biol* 80:237–244
14. Morgenthaler NG, Müller B, Struck J, Bergmann A, Redl H, Christ-Crain M (2007) Copeptin, a stable peptide of the arginine vasopressin precursor, is elevated in hemorrhagic and septic shock. *Shock* 28:219–226
15. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Müller B (2005) Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care* 9:R816–R824
16. Seligman R, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Meisner M, Teixeira PJ (2008) Copeptin, a novel prognostic biomarker in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care* 12:R11

17. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Stolz D, Müller C, Bingisser R, Harbarth S, Tamm M, Struck J, Bergmann A, Müller B (2006) Pro-adrenomedullin to predict severity and outcome in community-acquired pneumonia. *Crit Care* 10:R96
18. Masiá M, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Hernández I, Shum C, Gutiérrez F (2007) Midregional pro-A-type natriuretic peptide and carboxy-terminal provasopressin may predict prognosis in community-acquired pneumonia. *Clin Chem* 53:2193–2201
19. Müller B, Morgenthaler N, Stolz D, Schuetz P, Müller C, Bingisser R, Bergmann A, Tamm M, Christ-Crain M (2007) Circulating levels of copeptin, a novel biomarker, in lower respiratory tract infections. *Eur J Clin Invest* 37:145–152
20. Krüger S, Papassotiriou J, Marre R, Richter K, Schumann C, von Baum H, Morgenthaler NG, Suttrop N, Welte T, CAPNETZ Study Group (2007) CAPNETZ Study Group: pro-atrial natriuretic peptide and pro-vasopressin to predict severity and prognosis in community-acquired pneumonia: results from the German competence network CAPNETZ. *Intensive Care Med* 33:2069–2078
21. Bone RC (1992) Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 268:3452–3455
22. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Biennu J, Gueyffier F, Vanhems P (2006) Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 32:1175–1183
23. McCabe WR, Jackson GC (1962) Gram-negative bacteremia. *Arch Intern Med* 110:847–864
24. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F (1993) A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270:2957–2963
25. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S (1998) Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* 26:1793–1800
26. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A (2005) Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem* 51:1823–1829
27. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A (2006) Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem* 52:112–119
28. Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Bergmann A, Müller B (2007) Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium* 14:345–351
29. Khan SQ, Dhillon O, Struck J, Quinn P, Morgenthaler NG, Squire IB, Davies JE, Bergmann A, Ng LL (2007) C-terminal pro-endothelin-1 offers additional prognostic information in patients after acute myocardial infarction: Leicester acute myocardial infarction peptide (LAMP) study. *Am Heart J* 154:736–742
30. Khan SQ, O'Brien RJ, Struck J, Struck J, Quinn PA, Morgenthaler NG, Squire IB, Davies JE, Bergmann A, Ng LL (2007) Prognostic value of midregional pro-adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction: the LAMP (Leicester acute myocardial infarction peptide) study. *J Am Coll Cardiol* 49:1525–1532
31. Khan SQ, Dhillon OS, O'Brien RJ, Struck J, Quinn PA, Morgenthaler NG, Squire IB, Davies JE, Bergmann A, Ng LL (2007) C-terminal provasopressin (copeptin) as a novel and prognostic marker in acute myocardial infarction: Leicester acute myocardial infarction peptide (LAMP) study. *Circulation* 115:2103–2110
32. de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, Struck J, Morgenthaler NG, Papassotiriou J, Elliott PJ, van der Poll T (2008) The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. *Intensive Care Med* 34:518–522

Proatrial natriuretic peptide is a better predictor of 28-day mortality in septic shock patients than proendothelin-1

Caroline Guignant¹, Fabienne Venet¹, Nicolas Voirin², Françoise Poitevin¹, Christophe Malcus¹, Julien Bohé³, Alain Lepape³ and Guillaume Monneret^{1,*}

¹ Hospices Civils de Lyon, Hôpital E. Herriot, Laboratoire d'Immunologie, Lyon, France

² Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service d'Hygiène, Epidémiologie et Prévention and CNRS UMR 5558, Lyon, France

³ Hospices Civils de Lyon, CH Lyon-Sud, Intensive Care Units, Lyon, France

Abstract

Background: Septic shock is a major health care problem that affects a heterogeneous population of patients. To improve sepsis management, a key point is to decrease this heterogeneity by stratifying patients according to specific criteria, such as appropriate biomarkers. As the early phase of septic shock is characterized by cardiovascular dysfunction, precursors of vasoactive hormones represent interesting candidates. The objective of the present study was to concomitantly assess the predictive value of C-terminal proendothelin-1 and midregional proatrial natriuretic peptide (CT-proET-1 and MR-proANP, respectively vasoconstrictor and vasodilator) on 28-day mortality following septic shock.

Methods: In this observational study which included 99 patients, concentrations of MR-proANP and CT-proET-1 were measured using an immunoluminometric assay three times within the first week after the onset of septic shock.

Results: While MR-proANP concentrations were significantly increased in non-survivors in comparison with survivors, no differences were noted for CT-proET-1. Increased MR-proANP concentrations were significantly associated with mortality after both univariate and multivariate analyses, adjusted for usual clinical confounders [SAPS II (simplified acute physiology score II), SOFA (sepsis-related organ failure assessment) scores and number of co-morbidities].

Conclusions: In septic shock patients, MR-proANP appears to be a good predictor of 28-day mortality, whereas CT-

proET-1 does not present any predictive value during monitoring.

Clin Chem Lab Med 2010;48:1813–20.

Keywords: atrial natriuretic factor; endothelin-1; mortality; prognosis; septic shock.

Introduction

Sepsis is a major health care problem affecting 750,000 people annually in the USA, of which 215,000 die (1). Despite numerous clinical trials testing innovative therapeutic strategies, the mortality rate remains high, approaching 30% in case of severe sepsis, and up to 50% in case of septic shock, the most severe form of the septic syndromes (2–4).

During the last two decades, although progress has been made in the clinical management of sepsis [early appropriate antibiotherapy (5), early goal-directed therapy (6), treatment with activated protein C (7) or low-dose corticosteroids (8)] this was associated with little improvement in survival rates. One explanation for the relative absence of positive results of clinical trials is that they included a mostly heterogeneous populations of patients. Indeed, septic syndromes encompass patients presenting with heterogeneous disease severity, different clinical characteristics (genetic polymorphisms, co-morbidities, etc.), affected by different micro-organisms (type, virulence, infection load, etc.) and at different sites (9–11). Similar to the tumor, nodes and metastases (TNM) system developed in oncology, the PIRO-model (predisposition, insult, response and organ dysfunction) has recently been proposed to improve stratification of patients with sepsis (12). However, to bring more information on patients' pathophysiological response, robust biomarkers are needed.

Septic shock is characterized in its early phase by acute dysfunctions of the cardiovascular system that induces severe hypotension that is refractory to volume therapy (13, 14). Biomarkers reflecting this dysfunction may therefore be of major interest. Endothelin-1 (ET-1) is a potent vasopressive hormone (15), whereas atrial natriuretic peptide (ANP) is a vasodilator and exhibit natriuretic and diuretic properties (16). Several fragments of the precursors of these hormones [C-terminal proET-1 (CT-proET-1) and midregional proANP (MR-proANP)] have already been evaluated in the plasma of patients with sepsis. Briefly, on admission, concentrations were shown to increase gradually and correlate with severity, ranging from SIRS (systemic inflammatory response syndrome) to severe forms of sepsis (17–19). Increased concentrations were also measured in non-survivors (17–19).

*Corresponding author: Guillaume Monneret, PharmD, PhD, Flow Cytometry Unit, Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, 5, Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France
Phone: +33 4 72 11 97 58, Fax: +33 4 72 11 97 53,
E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

Received January 21, 2010; accepted June 24, 2010;
previously published online August 13, 2010

However, no study has been specifically devoted to septic shock.

The objective of this study was to assess the predictive value of CT-proET-1 and MR-proANP (respectively one vasoconstrictor and one vasodilator) on 28-day mortality following septic shock.

Patients and methods

Patients

This study was performed in 99 consecutive patients with septic shock according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (20). This cohort had been previously included in a study investigating percentages of human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) expressing monocytes after septic shock (21). Patients were admitted to the two participating ICUs (intensive care units, one medical, one surgical) of the Lyon-Sud University Hospital (Hospices Civils de Lyon, France). Septic shock was defined by an identifiable site of infection, evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: a) temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$; b) heart rate >90 beats per minute; c) respiratory rate >20 breaths per minute; d) white blood cell count $>12,000/\text{mm}^3$ or $<4000/\text{mm}^3$ and persistent hypotension despite fluid resuscitation and requiring vasopressor therapy. The onset of septic shock was defined by the beginning of vasopressive therapy. The only exclusion criteria were patients younger than 18 years of age and the absence of circulating leukocytes. During follow-up, clinical and biological parameters were measured. The data collection included demographic characteristics (age, gender); admission category (elective or emergency surgery, medicine); referral pattern (community, hospital or ICU-acquired septic shock); microbiological findings (characteristics of the infection, such as the source and the identified micro-organism), delay between the onset of septic shock and admission into the hospital and ICU (septic shock was considered hospital-acquired when it began at least 48 h after hospital admission); co-morbidities (chronic heart, kidney, respiratory or hepatic failures, metastatic cancer, type 1 diabetes, malignant hemopathy, immunodepressive state or acquired immune deficiency syndrome) and outcome after 28 days (death or survival). Two clinical scores were recorded: severity at the onset of shock assessed by the simplified acute physiology score II (SAPS II, range: 0–194) (22) and the sepsis-related organ failure assessment score (SOFA, range: 0–24) calculated at days 1–2 and 3–4 after the onset of shock (23).

This prospective study was reviewed by our Institutional Ethics Committee. The Committee waived the need for informed consent because pro-hormone measurements were performed on residual blood after completing routine follow-up performed in our two ICUs (i.e., leukocyte counting and mHLA-DR measurements). Blood samples were obtained at days 1–2, 3–4, 5–7 after the onset of shock (one sample per period). Blood samples were not collected on Saturdays and Sundays because the laboratory was closed during these days, which accounts for most of the missing values.

Measurements of CT-proET-1 and MR-proANP

Blood samples were collected into tubes containing ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA). After centrifugation, plasma was maintained frozen at -80°C until analysis. Measurements were performed by the research department of BRAHMS AG (Hennigsdorf, Germany) in totally blinded fashion without knowledge of the clinical parameters.

MR-proANP and CT-proET-1 were measured using newly developed chemiluminescence sandwich immunoassays, as described elsewhere (24, 25). Antibodies directed against the mid-regional fragment of proANP were chosen, as opposed to the N-terminal region (proANP1-98) because this region might be minimally accessible to antibody binding (26). For proET-1, antibodies targeting the C-terminal fragment of this molecule were selected based on preliminary works performed by Struck et al. (27). Briefly, each immunoassay employed two polyclonal antibodies targeting specific fragments of each pro-hormone. Tubes were coated with one of these antibodies; the second antibody (labeled with an akridinium ester) was added to plasma samples (all kits were from BRAHMS). After incubation, tubes were washed several times with Lumitest wash solution (BRAHMS) and the bound chemiluminescence was measured with a luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany). The analytical detection limits were 6.0 pmol/L for MR-proANP and 0.4 pmol/L for CT-proET-1 (24, 25). In healthy individuals, the median concentration of MR-proANP is 45 pmol/L [95% confidence interval (95% CI): 43.0–49.1 pmol/L] and the mean concentration of CT-proET-1 is 44.3 pmol/L (95% CI: 43.1–45.4 pmol/L) (24, 25).

Statistical analysis

The clinical and biological parameters for patients were described using frequencies, percentages, medians and inter-quartile ranges (IQR). The two groups of patients (28-day survivors and non-survivors) were compared using the Mann-Whitney U-test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical data. Predictive value on mortality was evaluated by analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves calculated at days 1–4 or 5–7. Survival estimates were based on the method of Kaplan-Meier, and comparison of survival distribution was based on the log-rank test. Univariate and multivariate logistic regression was used to identify the variables associated with the risk of death assessed using the odds ratio (OR) and their 95% CIs. Variables with a p-value ≤ 0.15 in univariate analysis were entered in the multivariate model. The parameters included patient gender, age, number of co-morbidities, main diagnosis category, type of infection, site of infection, SAPS II and SOFA scores, and pro-hormone measurements. Continuous variables, such as age, SAPS II and SOFA scores were categorized using a cut-off value based on the population median. Pro-hormones were stratified using the best threshold indicated by the ROC curve analysis performed at days 1–2, 3–4 or 5–7 (i.e., best sensitivity and specificity). A p-value < 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using SPSS software (version 12.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Ninety-nine patients with septic shock were included in the study (58 men and 41 women). The median age at admission was 67 years (IQR: 54–76 years). Main co-morbidities were chronic respiratory failure (16.2% of patients), chronic heart failure (8.1%), type 1 diabetes (7.1%), metastatic cancer (7.1%), chronic kidney failure (6.1%) and immunodepression (6.1%). At the time of diagnosis of shock, the median SAPS II score was 51 (IQR: 43–64) and the median SOFA score was 10 (IQR: 8–12), illustrating the high severity of this cohort. Twenty-eight day mortality was 35%. Table 1 gives the demographic, clinical and biological data. As typically reported in similar cohorts of patients, SAPS II at admission,

Table 1 Demographical, clinical and biological data for septic shock patients.

Parameters	Survivors n = 64 (65%)	Non-survivors n = 35 (35%)	p-Value	Overall population n = 99
Age at admission, years	67 (53–75)	70 (55–78)	0.228	67 (54–76)
Gender				
Male, n (%)	39 (60.9)	19 (54.3)	0.531	58 (58.6)
SAPS II at diagnosis of shock	49 (41–55)	66 (56–75)	<0.001	51 (43–64)
SOFA score				
1. SOFA D1–D2	9 (8–12)	12 (10–14)	0.002	10 (8–12)
2. SOFA D3–D4	9 (6–11)	14 (10–17)	<0.001	10 (7–13)
Number of co-morbidities				
0, n (%)	42 (65.6)	15 (42.9)	0.035	57 (57.6)
≥ 1, n (%)	22 (34.4)	20 (57.1)		42 (42.4)
Delay shock – ICU (days)	0 (0–1)	0 (0–1)	0.663	0 (0–1)
Length of ICU stay	12 (8–29)	5 (2–13)	<0.001	11 (5–23)
Rate of intubation in patients, n (%)	54 (84.4)	35 (100)	0.024	89 (89.9)
Length of intubation	10 (4–22)	4 (2–11)	0.001	7.5 (3–19)
Main diagnosis category				
Medical, n (%)	30 (46.9)	20 (57.1)	0.402	50 (50.5)
Surgery, n (%)	34 (53.1)	15 (42.9)		49 (49.5)
Catecholamine (D1–2)				
Epinephrine (E) or norepinephrine (NE), n (%)	27 (42.9)	13 (38.2)	0.829	40 (41.2)
Dobutamine, n (%)	6 (9.5)	2 (5.9)	0.709	8 (8.2)
E or NE and dobutamine, n (%)	30 (47.6)	19 (55.9)	0.525	49 (50.5)
Dosages of E or NE, µg/kg/min	0.51 (0.33–0.87)	1.16 (0.61–1.89)	0.001	0.60 (0.36–1.31)
Infection (n, %)				
Diagnosis	63 (98.4)	34 (97.1)		97 (98.0)
Radiology	6 (9.4)	3 (8.6)	0.917	9 (9.1)
Surgery	6 (9.4)	2 (5.7)		8 (8.1)
Microbiologically documented	50 (78.1)	29 (82.9)		79 (79.8)
Bacilli Gram –	32 (64.0)	16 (55.2)	0.480	48 (60.8)
Cocci Gram +	27 (54.0)	15 (51.7)	0.999	42 (53.2)
Fungi	13 (26.0)	12 (41.4)	0.210	25 (31.6)
Others	7 (14.0)	5 (17.2)	0.751	12 (15.2)
Type of infection				
Community acquired	28 (43.8)	20 (57.1)	0.215	48 (48.5)
Nosocomial	36 (56.2)	15 (42.9)		51 (51.5)
In hospital	35 (97.2)	14 (93.3)		49 (96.1)
In ICU	1 (2.8)	1 (6.7)		2 (3.9)
Site of infection				
Pulmonary	25 (39.1)	17 (48.6)	0.565	42 (42.4)
Abdominal	27 (42.2)	14 (40.0)		41 (41.4)
Others	12 (18.8)	4 (11.4)		16 (16.2)

Values are presented as medians and inter-quartile ranges (IQR) for continuous variables, and as number of cases and percentages for categorical data. Statistical analysis: Mann-Whitney U-test was used for continuous variables and Fisher's exact test for categorical data. D, day; ICU, intensive care unit.

SOFA score at days 1–2 and 3–4, and the number of co-morbidities were significantly different between survivors and non-survivors. There was no statistical difference for parameters related to infection (main diagnosis category, germs, type and site of infection) or for demographic characteristics (age and gender) between these two groups. Concentrations of the two pro-hormones measured in survivors and non-survivors are shown in Figure 1. MR-proANP was significantly increased in non-survivors in comparison with survivors during the entire monitoring period, whereas no significant differences were observed for CT-proET-1. ROC

curve analyses were performed for each pro-hormone at different time points (Table 2). During the entire monitoring period, MR-proANP showed an increased area under the curve (AUC) compared to CT-pro-ET-1; and its AUC value increased over time. On the basis of optimal thresholds (determined by ROC curve analyses), prognostic parameters (positive and negative predictive values, positive and negative likelihood ratios) were also calculated for the two pro-hormones (Table 3).

A multivariate analysis was performed to test the predictive value on 28-day mortality for variables selected on the

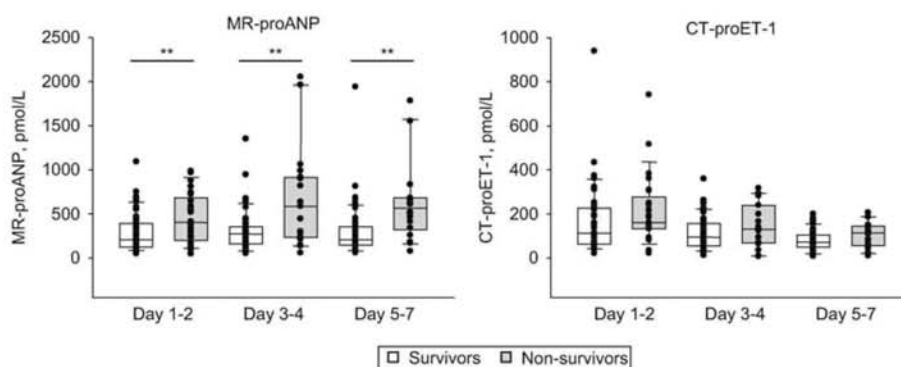


Figure 1 MR-proANP and CT-proET-1 measurements in survivors and non-survivors after septic shock. Results are presented as box-plots (white boxes = survivors, grey boxes = non-survivors) and individual values. **p-Value ≤ 0.01 (Mann-Whitney U-test).

basis of univariate analysis (variables presenting with $p \leq 0.15$, data not shown). Only the number of co-morbidities, the SAPS II and SOFA scores and MR-proANP concentrations were included in the model (Table 4). At day 1–2, only SAPS II remained independently associated with mortality ($OR_{D1-2} = 3.90$; 95% CI: 1.07–14.17; $p = 0.039$). At days 3–4 and days 5–7, MR-proANP showed good prognostic value ($OR_{D3-4} = 8.28$; 95% CI: 1.45–47.33; $p = 0.017$ and $OR_{D5-7} = 8.35$; 95% CI: 2.33–29.95; $p = 0.001$). This is also illustrated by the survival curves obtained after Kaplan-Meier analysis (Figure 2).

Of note, doses of catecholamines administered to the patients as well as those with impaired renal function could have resulted in increases in pro-hormone after septic shock. Although these parameters are included in the calculation of the SOFA score and are thus taken into account in the multivariate analysis, we tested them separately in a subsequent multivariate analyses, along with MR-proANP concentrations. In accordance with the above results, in the subsequent statistical analyses, MR-proANP retained independent predictive value on mortality (data not shown). This confirms that the link between increased MR-proANP concentrations and mortality after septic shock could not solely be explained

by alterations in renal function and/or the magnitude of catecholamine treatment.

Discussion

The septic shock population is characterized by great heterogeneity (9, 10), which represents a major problem because patients with different co-morbidities, infected at various sites by diverse micro-organisms, may need different types of treatment and may respond differently to these treatments. This has been proposed as one reason explaining the failure of numerous clinical trials testing innovative therapies in sepsis (9). One method to reduce this heterogeneity is to appropriately stratify patients before treating them with tailored therapy.

Although clinical scores, such as the SOFA score, have been shown to be good predictors of mortality after sepsis (28), they cannot be calculated rapidly at the patient's bedside as this requires the collection of a large amount of clinical data. This delay compromises their use in management of daily septic shock as septic syndromes need rapid diagnostic parameters to initiate rapid treatment. Patient stratification therefore requires specific biological tools to help clinicians adjust diagnosis and treatment.

Relevant biomarkers could actually supply information to clinicians at different key levels. First, they can be used as quick diagnostic tools of sepsis in ICU patients. They can also help stage severity and prognosis, allowing clinicians to individually adapt treatment, for example by treating patients with more severe disease with more aggressive therapies. Finally, biomarkers could participate in the monitoring of the clinical response (and side effects) to specific treatments (29).

In septic shock, biomarkers of cardiovascular function may be of high clinical interest because this pathology is characterized in its early phase by marked hemodynamic dysfunction (30). Consequently, dosages of vasoactive hormones playing a key role in arterial pressure homeostasis

Table 2 ROC curve analysis of MR-proANP and CT-proET-1 measurements within the first week after septic shock.

	Parameters	Area under curve	p-Value	95% CI	
				Lower limit	Upper limit
Day 1–2	MR-proANP	0.678	0.013	0.545	0.811
	CT-proET-1	0.635	0.058	0.504	0.766
Day 3–4	MR-proANP	0.699	0.011	0.545	0.854
	CT-proET-1	0.590	0.248	0.428	0.752
Day 5–7	MR-proANP	0.782	<0.001	0.649	0.915
	CT-proET-1	0.644	0.066	0.488	0.800

Numbers of samples: day 1–2 = 75 samples (50 S + 25 NS); day 3–4 = 71 samples (52 S + 19 NS); day 5–7 = 77 samples (59 S + 18 NS). CI, confidence interval; NS, non-survivors; S, survivors.

Table 3 Prognostic performance of MR-proANP and CT-proET-1.

	Optimal cut-off values	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	Likelihood ratio+	Likelihood ratio-
Day 1–2	MR-proANP >300 pmol/L	0.60	0.64	0.45	0.76	1.67	0.63
	CT-proET-1 >135 pmol/L	0.72	0.52	0.43	0.79	1.50	0.54
Day 3–4	MR-proANP >430 pmol/L	0.58	0.83	0.55	0.84	3.35	0.51
	CT-proET-1 >115 pmol/L	0.58	0.60	0.34	0.79	1.43	0.71
Day 5–7	MR-proANP >390 pmol/L	0.72	0.81	0.54	0.91	3.87	0.34
	CT-proET-1 >95 pmol/L	0.56	0.73	0.38	0.84	2.05	0.61

Positive predictive value measures the percentage of non-survivors when value > optimal threshold; and negative predictive value the percentage of survivors when value ≤ optimal threshold.

may provide valuable information. However, as mature hormones are rapidly removed from plasma, their precursor forms which are cleaved in stoichiometric fashion, are easier to measure. For example, ET-1 and ANP present with half-

lives of a few minutes, whereas their precursor forms have much longer half-lives (superior to 6 h ex vivo) (15, 24, 25, 31). Of importance, measurement of MR-proANP and CT-proET-1 can be managed easily and are compatible with rou-

Table 4 Multivariate logistic regression analysis of MR-proANP measurements at days 1–2, 3–4 and 5–7 after septic shock.

	Parameters	OR	95% CI		p-Value	
			Lower limit	Upper limit		
Day 1–2	SAPS II					
	≤51	1.00	–	–	–	
	>51	3.90	1.07	14.17	0.039	
	SOFA score					
	≤10	1.00	–	–	–	
	>10	3.23	0.92	11.35	0.068	
	Number of co-morbidities					
	0	1.00	–	–	–	
≥1	2.27	0.72	7.16	0.161		
MR-proANP	≤300	1.00	–	–	–	
	>300	2.00	0.65	6.13	0.227	
	Day 3–4	SAPS II				
		≤51	1.00	–	–	–
>51		5.28	0.81	34.52	0.082	
SOFA score						
≤10		1.00	–	–	–	
>10		0.60	0.10	3.77	0.586	
Number of co-morbidities						
0		1.00	–	–	–	
≥1	6.51	1.26	33.65	0.025		
MR-proANP	≤430	1.00	–	–	–	
	>430	8.28	1.45	47.33	0.017	
	Day 5–7	SAPS II				
≤51		1.00	–	–	–	
>51		3.10	0.82	11.71	0.095	
Number of co-morbidities						
0		1.00	–	–	–	
≥1		3.53	0.94	13.30	0.062	
MR-proANP						
≤390		1.00	–	–	–	
>390	8.35	2.33	29.95	0.001		

SAPS II and SOFA score cut-offs were determined as the median value of the overall population. MR-proANP optimal thresholds were chosen at each time-point according to ROC curve analyses. MR-proANP concentrations are expressed in pmol/L. CI, confidence interval; OR, odds ratio.

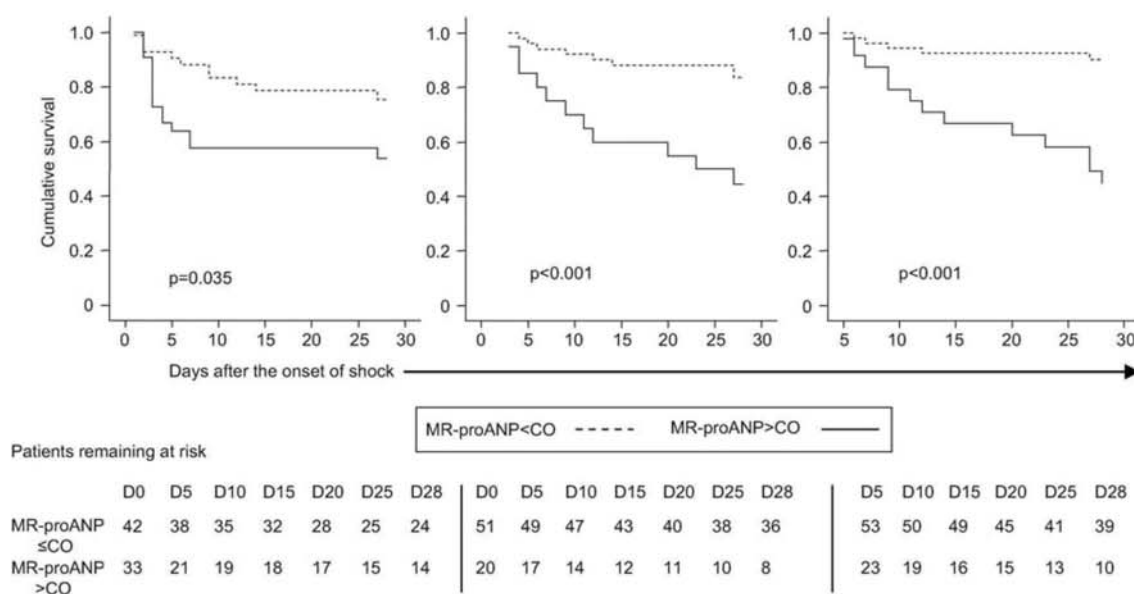


Figure 2 Kaplan-Meier survival curves stratified according to MR-proANP measurements at days 1–2, 3–4 and 5–7 after the onset of septic shock.

Log-rank test was performed. CO, respective cut-off as provided in Table 3.

tine activity. Indeed, they can be measured in blood and results can be given to clinicians rapidly. For example, MR-proANP measurements can be performed in <math>< 2</math> h using a commercially available immunoassay (BRAHMS Seristra[®] LIA).

Little data is available concerning the use of MR-proANP and CT-proET-1 in septic shock patients. In septic syndromes, concentrations of these pro-hormones have been shown to increase with respect to severity (from SIRS to septic shock) (17–19). Moreover, in this cohort, MR-proANP was significantly augmented in non-survivors compared with survivors (18, 19), whereas no differences were observed for CT-proET-1 (17). Of note, N-terminal proBNP (NT-proBNP), another natriuretic peptide-type hormone precursor, was shown to be increased in non-survivors compared with 39 septic shock patients who survived (32), and in a mixed cohort of patients with severe sepsis and septic shock (33). In agreement with these findings, we observed that MR-proANP was significantly increased in non-survivors compared with survivors, whereas CT-proET-1 did not show any predictive value. Moreover, ROC curve analyses showed that MR-proANP provided better predictive value on mortality compared with CT-proET-1. Similar results were obtained on different and more heterogeneous cohorts of critically ill patients. In a study that included 101 patients with SIRS and septic syndromes (ranging from sepsis to septic shock) that evaluated predictive value on 28-day mortality, MR-proANP showed an AUC of 0.88. In another cohort of 71 septic patients (including 16 with septic shock), the AUC was 0.71 on admission (18, 19). In contrast, in a cohort of 95 patients with SIRS or sepsis, the AUC of CT-proET-1 was 0.49 (17).

Of importance, we performed a multivariate analysis which showed that MR-proANP retained its predictive value on mortality at days 3–4 and days 5–7 when adjusted for usual clinical confounders ($OR_{D3-4} = 8.28 [1.45-47.33]$ and $OR_{D5-7} = 8.35 [2.33-29.95]$). This was also illustrated by survival curves obtained using Kaplan-Meier analysis (Figure 2). Most importantly, we observed that a persistent elevation in MR-proANP over time was associated with mortality. This is in agreement with previous results using midregional pro-adrenomedullin, another precursor of a vasodilating hormone, in septic shock patients (34). One may hypothesize that persistent vasodilatation and hypotension in septic shock patients may participate in progressive organ failure and lead ultimately to poor outcome.

In this study, CT-proET-1 showed poor predictive value for mortality following septic shock. This lack of predictive information may be related to the decreased stability of this precursor compared with MR-proANP. Indeed, ex vivo stability of CT-proET-1 was shown to be only 6 h at 4°C vs. more than 48 h for MR-proANP under the same conditions (24, 25).

Our study has some limitations. First, this study was not designed specifically to measure hemodynamic parameters. In addition, data is missing for some patients (14 values for non-survivors and 10 values for survivors at days 1–2) because blood was not collected on Saturdays and Sundays. However, as data are missing in an equivalent number in these two groups of patients, we may postulate that this did not bias our results. Finally, although a total of 99 septic shock patients constitutes a rather large cohort, this sample size may be insufficient to perform multivariate analysis.

Thus, our results may have been underpowered, leading to large 95% CIs.

Conclusions

There is an urgent need to develop new biological tools helping to improve management of patients with septic shock. Well chosen biomarkers can help clinicians stratify patients according to severity of disease, and could enable individualized therapeutic management. Pro-hormones that can be measured rapidly and that reflect key pathways in the pathophysiology of septic shock represent good candidates for future biomarkers. Here, we report that MR-proANP appears to be a good predictor of 28-day mortality in a cohort of patients with septic shock. These results need to be confirmed in a large multicentric clinical study designed more specifically for the monitoring of cardiovascular dysfunction.

Acknowledgements

This work was supported by the Hospices Civils de Lyon and was conducted thanks to the support of BRAHMS – we especially thank Dr. N.G. Morgenthaler and Dr. A. Bergmann – and thanks to the logistical support (H. Thizy, F. Gueyffier) from the Centre d'Investigation Clinique (CIC 201) de Lyon (Clinical Research Centre) of INSERM and Hospices Civils de Lyon.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research support played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

Research funding: This work was supported by the Hospices Civils de Lyon and was conducted thanks to the support of BRAHMS.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303–10.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546–54.
- Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007;35:1244–50.
- Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30:580–8.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:1589–96.
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368–77.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699–709.
- Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008;358:111–24.
- Marshall JC. Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *J Leukoc Biol* 2008;83:471–82.
- Marshall JC, Reinhart K. International Sepsis Forum. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med* 2009;37:2290–8.
- Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal SM, Masur H. Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit Care Med* 2008;36:964–6.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250–6.
- Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Sarma JV, Ward PA. Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med* 2008;14:327–36.
- Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 2007;43:117–37.
- Shah R. Endothelins in health and disease. *Eur J Intern Med* 2007;18:272–82.
- Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998;339:321–8.
- Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Bergmann A, Müller B. Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium* 2007;14:345–51.
- Morgenthaler NG, Struck J, Christ-Crain M, Bergmann A, Müller B. Pro-atrial natriuretic peptide is a prognostic marker in sepsis, similar to the APACHE II score: an observational study. *Crit Care* 2005;9:R37–45.
- Seligman R, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Meisner M, Teixeira PJ. Prognostic value of midregional pro-atrial natriuretic peptide in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2008;34:2084–91.
- Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *J Am Med Assoc* 1992;268:3452–5.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32:1175–83.
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *J Am Med Assoc* 1993;270:2957–63.
- Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-relat-

- ed problems'' of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998;26:1793–800.
24. Morgenthaler NG, Struck J, Thomas B, Bergmann A. Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem* 2004;50:234–6.
 25. Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. *Clin Chem* 2006;52:1144–51.
 26. Seidler T, Pemberton C, Yandle T, Espiner E, Nicholls G, Richards M. The amino terminal regions of proBNP and proANP oligomerise through leucine zipper-like coiled-coil motifs. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:495–501.
 27. Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo. *Peptides* 2005;26:2482–6.
 28. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Melot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *J Am Med Assoc* 2001;286:1754–8.
 29. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95.
 30. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990;113:227–42.
 31. Lee CY, Burnett JC Jr. Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart Fail Rev* 2007;12:131–42.
 32. Roch A, Allardet-Servent J, Michelet P, Oddoze C, Forel JM, Barrau K et al. NH2 terminal pro-brain natriuretic peptide plasma level as an early marker of prognosis and cardiac dysfunction in septic shock patients. *Crit Care Med* 2005;33:1001–7.
 33. Varpula M, Pulkki K, Karlsson S, Ruokonen E, Pettila V. Predictive value of n-terminal pro-brain natriuretic peptide in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2007;35:1277–83.
 34. Guignant C, Voirin N, Venet F, Poitevin F, Malcus C, Bohé J, et al. Assessment of pro-vasopressin and pro-adrenomedullin as predictors of 28-day mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009;35:1859–67.

3. Persistent high level of circulating MR-proADM and increased risk of nosocomial infections after septic shock

Caroline Guignant, Nicolas Voirin, Fabienne Venet, Alain Lepape, Guillaume Monneret.

J trauma, 2011 (*in press*)

Du fait des dysfonctions immunitaires qu'ils présentent, les patients septiques sont une population particulièrement à risque de développer des infections nosocomiales secondaires. Pouvoir identifier les patients les plus à risque avant que l'infection ne débute serait une avancée dans leur prise en charge. Néanmoins, jusqu'à maintenant, aucun biomarqueur sérique n'a permis de réellement prévoir ce risque.

Rétrospectivement, sur la base des résultats obtenus par Bahrami *et al.* décrivant la capacité de *N-terminal-proCNP* (fragment précurseur du CNP, autre membre de la famille des peptides natriurétiques) à prédire l'incidence du sepsis dans une cohorte de patients polytraumatisés, nous avons testé la valeur prédictive des quatre précurseurs d'hormones (MR-proANP, MR-proADM, CT-proAVP et CT-proET-1) sur l'incidence des infections nosocomiales des 99 patients septiques précédemment étudiés.

Parmi les quatre pro-hormones évaluées, seule une concentration élevée de MR-proADM semble associée à un risque accru d'infections nosocomiales. Ce résultat novateur mais fragile au niveau statistique reste à confirmer dans une cohorte plus importante de patients.

Ref.: Ms. No. JOT-2011-18153R1

Persistent high level of circulating MR-proADM and increased risk of nosocomial infections after septic shock

The Journal of Trauma, Injury, Infection and Critical Care

Dear Dr Monneret:

Your manuscript has now been reviewed by the editorial consultants of the JOURNAL OF TRAUMA, and we are pleased to inform you that it has been accepted for publication.

Please note that we must have signed Copyright Assignment and Financial Disclosure forms from each author associated with this paper before your manuscript can be published in the JOURNAL OF TRAUMA.

IF YOU HAVE ALREADY SUBMITTED THESE FORMS PLEASE DISREGARD THIS REQUEST. If you have incomplete or missing forms, your manuscript will not be published until all signed forms have been received at our editorial office.

To access these forms, please visit our HOME PAGE at www.editorialmanager.com/jt. The links to these forms are located below the LOGIN button and beneath the FILES & RESOURCES heading. Please download, complete, sign, and forward these required forms to us at your earliest convenience. You may fax the forms to 210-342-2966 or email them to jtrauma@uthscsa.edu.

You will receive page proofs approximately one month prior to publication. To expedite publication, it is essential that you review those proofs within 48 hours and return them to LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, our publisher, via email, fax, or courier.

Sincerely,

Dr. Basil A. Pruitt, Jr.

Editor

The Journal of Trauma, Injury, Infection and Critical Care

**Persistent high level of circulating MR-proADM
and increased risk of nosocomial infections after septic shock**

Running head: proADM and nosocomial infection after septic shock

Caroline Guignant, MSc; Nicolas Voirin, PhD; Fabienne Venet, PharmD, PhD;

Alain Lepape, MD; Guillaume Monneret, PharmD, PhD

From the Immunology Laboratory, E. Herriot hospital, Hospices Civils de Lyon, France (CG, FV, GM) and EAM 4174 “Hémostase, inflammation, sepsis”, Claude Bernard University - Lyon 1, France - Hospices Civils de Lyon, France (CG, FV, GM, AL); Intensive Care Units, Lyon-Sud University Hospital, France (AL); Department of Hygiene, Epidemiology and Prevention, E. Herriot hospital, France, and Laboratory of Biometry and Evolutionary Biology, CNRS, UMR 5558, Claude Bernard University of Lyon, France (NV).

E-mail addresses for all authors:

caroline.guignant@chu-lyon.fr ; nicolas.voirin@chu-lyon.fr ; fabienne.venet@chu-lyon.fr ;
alain.lepape@chu-lyon.fr ; guillaume.monneret@chu-lyon.fr

Address requests for reprints to: Guillaume Monneret, PharmD, PhD
(guillaume.monneret@chu-lyon.fr)

Flow Cytometry Unit – Immunology Laboratory - Hôpital E. Herriot
5, place d'Arsonval - 69437 Lyon cedex 03 - France
tel: (33) 4 72 11 97 58 / fax : (33) 4 72 11 97 53

Financial supports: This research was supported by funds from the Hospices Civils de Lyon and was conducted thanks to the support of BRAHMS for pro-hormone measurements.

The present study was not presented at any meeting.

Introduction

Severe sepsis remains a major cause of death in intensive care units (ICU), with a mortality rate approaching 50% in case of septic shock (1). In addition, these patients are at high risk of developing nosocomial infections (NIs). Indeed, a recent study revealed a NIs attack rate of 23 cases per 100 septic shock patients (2). This could be partly explained by the development, after a first pro-inflammatory phase, of an immunosuppressive state mainly characterized by decrease of monocyte HLA-DR (mHLA-DR) expression, increase in circulating T regulatory lymphocyte percentage and lymphopenia due to apoptosis (3). The current clinical challenge is to identify patients at risk of infections before the onset of microbial development. A soluble marker, easily measurable in routine lab conditions and correlating with the risk of NI, would therefore be useful.

Recently, Bahrami *et al.* (4) showed the capacity of N-terminal proC-type natriuretic peptide (NT-proCNP) concentration to predict sepsis in a cohort of multiple-traumatized patients without brain injury. In septic shock patients, we have previously studied other precursors of vasoactive hormones for their predictive value on mortality, including: C-terminal-provasopressin (CT-proAVP or copeptin), midregional-proadrenomedullin (MR-proADM), midregional-proatrial natriuretic peptide (MR-proANP) and C-terminal-proendothelin-1 (CT-proET-1) (5, 6). Best results were obtained for CT-proAVP and MR-proADM. In another study, among these 4 prohormones, MR-proADM appeared as an excellent predictor of short (28 days) and long-term (180 days) mortality in patients with community acquired pneumonia (7).

In light of Bahrami's results, we addressed the question of whether these pro-hormones could also predict the occurrence of nosocomial infections in septic shock patients.

Patients and methods

Patients and Study Design

The study group consisted of 98 consecutive patients with septic shock according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine. This cohort of patients has been examined in previous studies for the prognostic value of four pro-hormones (5, 6). Septic shock was defined by an identifiable site of infection and evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: a) temperature $> 38^{\circ}\text{C}$ or $< 36^{\circ}\text{C}$; b) heart rate > 90 beats per minute; c) respiratory rate > 20 breaths per minute; d) white blood cell count $> 12\,000/\text{mm}^3$ or $< 4\,000/\text{mm}^3$ and hypotension persisting despite fluid resuscitation and requiring vasopressor therapy. The onset of septic shock was defined by the beginning of vasopressive therapy. The only exclusion criteria were patients younger than 18 years old and the absence of circulating leukocytes for flow cytometry phenotyping.

Two clinical scores were recorded: the severity at the onset of shock assessed by the Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II, range: 0–194) and the Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA, range: 0–24) score at day 1-2 and 3-4 after the onset of shock.

NIs were defined as microbiologically documented pulmonary infection, urinary tract infection, bloodstream infection and catheter-related infection that occurred 48 hours after ICU admission and up to ICU discharge (2).

Pro-hormone measurements were performed on residual blood after completing routine follow-up performed in the ICU, in accordance with the guidelines for clinical research of our institute, which waived the need for informed consent.

Measurements of pro-hormones

Measurements were performed in the research department of BRAHMS AG (Hennigsdorf, Germany) in a totally blinded fashion without knowledge of clinical parameters. Mediators were measured by chemiluminescence sandwich immunoassays in plasma as previously described (5, 6) at 3 time points: days (D) 1-2, 3-4 and 5-7 after the onset of septic shock. In healthy individuals, median concentration for CT-proAVP is 4.2 pmol/l [95% confidence interval (CI) 4.0–4.4 pmol/l] and for MR-proANP is 45 pmol/L [95% CI: 43.0–49.1 pmol] (8, 9). Mean concentration for MR-proADM is 0.33 nmol/l [95% CI: 0.32– 0.34 nmol/L] and for CT-proET-1 is 44.3 pmol/L (95% CI: 43.1–45.4 pmol/L) (10, 11).

Statistical analysis

Patients' clinical and biological parameters were described using frequencies, percentages, medians and interquartile ranges (IQR). The two groups of patients (developing NIs or without NIs) were compared using Mann-Whitney U-test for continuous variables, and Fisher's exact test for categorical data. Pro-hormones concentrations were log-transformed to meet normality assumptions, checked by the Kolmogorov-Smirnov test. Overtime variation of pro-hormone concentrations (between J1-2 and J5-7) were compared between groups using two-way Analysis Of Variance (ANOVA). This model tested differences in pro-hormone concentration between patients developing NIs and those without NIs, taking the effect of time into account. A p value < 0.05 was considered as statistically significant. The analyses were performed using SPSS software (version 12.0, SPSS, Chicago, IL).

Results

Patient clinical characteristics are shown in Table 1. No differences in clinical data between patients with NIs and those without NIs were observed for age, gender, number of comorbidities, and severity scores.

Similarly, regarding circulating pro-hormone concentrations in Table 2, no significant differences were observed between groups for CT-proET-1, CT-proAVP and MR-proANP (p-values = 0.99, 0.80 and 0.18 respectively). In contrast, significantly elevated MR-proADM concentrations were measured in patients who were going to develop NIs (p=0.043, Figure 1 and Table 1) after ANOVA analysis.

Discussion

MR-proADM has already been studied for its predictive value of mortality in different cohorts of septic patients and exhibited convincing results. In septic shock patients, MR-proADM had good predictive value when estimated by receiver-operating-characteristic analysis with Area Under Curve (AUC) as high as 0.86 when measured at day 5-7 after the onset of septic shock (5). In multivariate analysis, after adjustment on usual clinical variables, MR-prADM remained significantly associated with fatal outcome (Odds-ratio day 5-7 = 20.11; 95% CI 4.29–94.19; p<0.001) (5). In two recent studies recruiting either patients with community-acquired pneumonia or lower respiratory tract infections, MR-proADM performed significantly better than any of the other biomarkers (CT-proAVP, CT-proET-1, MR-proANP, procalcitonin or C-reactive protein) tested simultaneously for prediction of mortality (7, 12).

In the present analysis, the novelty is that MR-proADM could also provide predictive information on nosocomial infection development in septic shock patients. Interestingly, it is known that ADM, which can be secreted by several leukocyte subpopulations, possesses anti-

inflammatory properties (13). Indeed it was shown that ADM could suppress Lipopolysaccharide (LPS)-induced pro-inflammatory cytokine production in different cellular models. Also, this molecule could inhibit neutrophil chemotaxis by modulating CD11b expression. Moreover, in animal models of sepsis, *in vivo* administration of ADM after LPS-induced endotoxemia or cecal ligation and puncture reduced plasma levels of TNF- α , IL-1 and IL-6 while increasing plasma level of IL-10 (13, 14). Taken together, these data may indicate that ADM could participate in the delayed process of sepsis-induced immunosuppression which is believed to be closely associated with increased risk of nosocomial infections (3). This point requires additional investigations.

The main limitation of this short report is that it is based on a study initially designed for assessing the predictive value of precursors of vasoactive hormones on mortality, not on the occurrence of nosocomial infections. Some clinical parameters were thus not recorded (e.g., length of intubation). Nevertheless, the present results suggest that it would be interesting to specifically evaluate the association between pro-ADM concentrations and NI risk in a larger cohort of septic patients. Moreover, as decreased expression of mHLA-DR is now proposed as a gold standard not only to identify ICU patients with immunosuppression but also patients at increased risk of NIs after septic shock (15), comparing pro-ADM (a soluble biomarker) and mHLA-DR expression (a cell surface biomarker) performances in regard with NI risk would be of interest. Taken together, our results and those of Bahrami *et al.* (4) indicate a new potential use for certain pro-hormones as biomarkers. Indeed, to the best of our knowledge, no soluble biomarker has been shown to be able to identify ICU patients at risk of NIs. Those patients could benefit from focused strategies aimed at reducing infectious risk: intensive screening of infections, the limitation of other risk factors (such as catheters, invasive device), strict precautions to limit cross transmission, or therapeutic strategies aimed at boosting

Acknowledgments

This work was supported by the Hospices Civils de Lyon and was conducted thanks to the support of BRAHMS – we especially thank Dr. N.G. Morgenthaler and Dr. A. Bergmann – and thanks to the logistical support (H. Thizy, F. Gueyffier) from the Centre d'Investigation Clinique (CIC 201) de Lyon (Clinical Research Centre) of INSERM and Hospices Civils de Lyon.

References

1. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006;34:344-353.
2. Landelle C, Lepape A, Francais A, et al. Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:1054-1065.
3. Monneret G, Venet F, Pachot A, et al. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med.* 2008;14:64-78.
4. Bahrami S, Pelinka L, Khadem A, et al. Circulating NT-proCNP predicts sepsis in multiple-traumatized patients without traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 2010;38:161-166.
5. Guignant C, Voirin N, Venet F, et al. Assessment of pro-vasopressin and pro-adrenomedullin as predictors of 28-day mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 2009;35:1859-1867.
6. Guignant C, Venet F, Voirin N, et al. Proatrial natriuretic peptide is a better predictor of 28-day mortality in septic shock patients than proendothelin-1. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48:1813-1820.

7. Kruger S, Ewig S, Giersdorf S, et al. Cardiovascular and inflammatory biomarkers to predict short- and long-term survival in community-acquired pneumonia: Results from the German Competence Network, CAPNETZ. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:1426-1434.
8. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, et al. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem.* 2006;52:112-119.
9. Morgenthaler NG, Struck J, Thomas B, et al. Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem.* 2004;50:234-236.
10. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, et al. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem.* 2005;51:1823-1829.
11. Papassotiropoulos J, Morgenthaler NG, Struck J, et al. Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. *Clin Chem.* 2006;52:1144-1151.
12. Schuetz P, Wolbers M, Christ-Crain M, et al. Prohormones for prediction of adverse medical outcome in community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections. *Crit Care.* 2010;14:R106.
13. Zudaire E, Portal-Nunez S, Cuttitta F. The central role of adrenomedullin in host defense. *J Leukoc Biol.* 2006;80:237-244.
14. Miksa M, Wu R, Cui X, et al. Vasoactive hormone adrenomedullin and its binding protein: anti-inflammatory effects by up-regulating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Immunol.* 2007;179:6263-6272.
15. Landelle C, Lepape A, Voirin N, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* 2010;36:1859-1866.

Table 1. Clinical characteristics of septic shock patients.

	Patients with nosocomial infections (n=20)	Patients without nosocomial infections (n=78)	p-value	Overall population (n=98)
Age at admission	70 [56-79]	68 [53-76]	0.400	68 [54-77]
Gender, male: n (%)	10 (50)	48 (62)	0.446	58 (59)
Number of comorbidities				
0, n (%)	11 (55)	45 (58)	1.0	56 (57)
≥1, n (%)	9 (45)	33 (42)		42 (43)
SAPS II at diagnostic of shock	53 [48-63]	51 [42-64]	0.364	51 [43-63]
SOFA score at D1-2	11 [10-12]	10 [8-12]	0.215	10 [8-12]
Non-survivors: n (%)	6 (30)	29 (37)	0.611	35 (36)

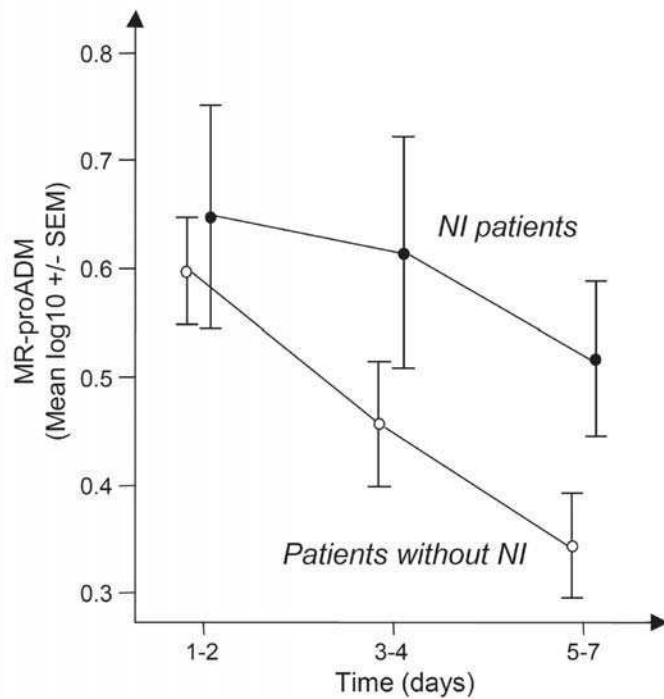
Values are presented as median and IQR in brackets for continuous variables or as number of cases and percentages for categorical data. Mann-Whitney U-test was performed for continuous variables (clinical data and scores) and Fisher's exact test for categorical data between patients developing nosocomial infections (NIs) and patients without NIs. (D: day, IQR: interquartile ranges, SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II, SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment).

Table 2. Pro-hormone measurements in septic shock patients.

	Patients with nosocomial infections (n=20)	Patients without nosocomial infections (n=78)	p-value	Overall population (n=98)
MR-proADM (nmol/l)				
D1-2	4.4 [2.0-9.8]	4.3 [2.0-8.8]	0.043	4.3 [2.0-8.9]
D3-4	4.4 [1.4-9.3]	2.8 [1.3-7.0]		3.3 [1.4-7.3]
D5-7	3.0 [2.2-5.6]	2.1 [1.2-4.6]		2.5 [1.3-4.9]
MR-proANP (pmol/l)				
D1-2	339 [173-434]	246 [138-544]	0.184	254 [141-482]
D3-4	329 [222-443]	278 [158-538]		296 [167-443]
D5-7	366 [231-622]	214 [142-422]		262 [164-489]
CT-proAVP (pmol/l)				
D1-2	75 [46-159]	84 [54-154]	0.799	83 [52-155]
D3-4	51 [25-88]	41 [26-100]		43 [26-91]
D5-7	32 [21-70]	30 [22-55]		31 [21-60]
CT-proET-1 (pmol/l)				
D1-2	132 [74-318]	149 [75-231]	0.991	141 [74-238]
D3-4	92 [56-161]	113 [65-175]		103 [61-167]
D5-7	71 [45-121]	79 [48-117]		77 [48-118]

Values are presented as median and IQR in brackets. Pro-hormone concentrations are presented in the table, but variance analysis (adjusted on time) was performed on their logarithmic concentrations in order to normalize their distribution. (D: day, IQR: interquartile ranges).

Figure 1. Differential MR-proADM concentrations in septic shock patients based on the occurrence of nosocomial infections. ANOVA analysis was performed at days 1-2, 3-4 and 5-7 after the onset of septic shock on 74, 70 and 76 patients respectively (overall population = 98). MR-proADM concentrations were normalized by logarithmic transformation. Means +/- standard error of the mean (SEM) are represented in patients that secondary developed NIs and those without NIs.



4. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients

Caroline Guignant, Alain Lepape, Xin Huang, Hakim Kherouf, Laure Denis, Françoise Poitevin, Christophe Malcus, Aurélie Chéron, Bernard Allaouchiche, François Gueyffier, Alfred Ayala, Guillaume Monneret, Fabienne Venet.

Critical Care 2011, 15:R99

Après un choc septique, les patients présentent un état d'immunodépression qui les rend plus susceptibles de développer des infections nosocomiales et augmente leur risque de mortalité. D'autres pathologies se caractérisent par une défaillance du système immunitaire. C'est le cas des infections virales chroniques comme les hépatites B ou C ou les infections dues au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), au cours desquelles les lymphocytes présentent un état d'« épuisement cellulaire ». Le système de co-récepteur inhibiteur PD-1 (composé d'un récepteur PD-1 et de ses ligands PD-L1 et PD-L2) est directement impliqué dans ces dysfonctions immunitaires. Nous avons choisi d'étudier l'expression du système PD-1 (mesurée par cytométrie en flux) et avons fait l'hypothèse de sa potentielle implication dans la physiopathologie septique.

Nos résultats ont mis en évidence la sur-expression du système PD-1 sur les lymphocytes CD4⁺ et les monocytes de patients en choc septique (par rapport à des sujets sains et des polytraumatisés), ainsi que l'implication de ce système dans les dysfonctions immunitaires (production de cytokine anti-inflammatoire, baisse de la prolifération lymphocytaire). Cette expression a été par ailleurs associée à la survenue d'infections nosocomiales et au risque de mortalité.

RESEARCH

Open Access

Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients

Caroline Guignant¹, Alain Lepape², Xin Huang³, Hakim Kherouf¹, Laure Denis⁴, Françoise Poitevin¹, Christophe Malcus¹, Aurélie Chéron⁵, Bernard Allaouchiche⁵, François Gueyffier⁶, Alfred Ayala³, Guillaume Monneret^{1*} and Fabienne Venet^{1†}

Abstract

Introduction: Septic shock remains a major health care problem worldwide. Sepsis-induced immune alterations are thought to play a major role in patients' mortality and susceptibility to nosocomial infections. Programmed death-1 (PD-1) receptor system constitutes a newly described immunoregulatory pathway that negatively controls immune responses. It has recently been shown that PD-1 knock-out mice exhibited a lower mortality in response to experimental sepsis. The objective of the present study was to investigate PD-1-related molecule expressions in septic shock patients.

Methods: This prospective and observational study included 64 septic shock patients, 13 trauma patients and 49 healthy individuals. PD-1-related-molecule expressions were measured by flow cytometry on circulating leukocytes. Plasmatic interleukin (IL)-10 concentration as well as *ex vivo* mitogen-induced lymphocyte proliferation were assessed.

Results: We observed that septic shock patients displayed increased PD-1, PD-Ligand1 (PD-L1) and PD-L2 monocyte expressions and enhanced PD-1 and PD-L1 CD4⁺ T lymphocyte expressions at day 1-2 and 3-5 after the onset of shock in comparison with patients with trauma and healthy volunteers. Importantly, increased expressions were associated with increased occurrence of secondary nosocomial infections and mortality after septic shock as well as with decreased mitogen-induced lymphocyte proliferation and increased circulating IL-10 concentration.

Conclusions: These findings indicate that PD-1-related molecules may constitute a novel immunoregulatory system involved in sepsis-induced immune alterations. Results should be confirmed in a larger cohort of patients. This may offer innovative therapeutic perspectives on the treatment of this hitherto deadly disease.

Introduction

Sepsis remains a major health-care problem worldwide [1]. For example, during the last decade, its hospitalization rate has almost doubled in the US [2]. This is associated with a mortality rate approaching 50% in the case of septic shock [3,4], despite the development of novel treatments such as early appropriate antibiotherapy, early goal-directed therapy, and activated protein C. Therefore, a better understanding of pathophysiology of

severe sepsis is a necessity if we are to decrease the high mortality rate of this condition.

Septic pathophysiology is a culmination of multiple complex dynamic processes whose interactions are only partially understood. However, it is now accepted that after a rapid proinflammatory response, a counter-regulatory phase characterized by immune alterations impacting both innate and adaptive responses develops [1,5,6]. This second phase has been characterized by an increased production of anti-inflammatory cytokines (mainly interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor-beta) [7], increased lymphocyte apoptosis [8], increased proportion of circulating regulatory T cells

* Correspondence: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

† Contributed equally

¹Hospices Civils de Lyon, Hôpital E. Herriot, Laboratoire d'Immunologie, 5 Place d'Arsonval, 69003 Lyon, France

Full list of author information is available at the end of the article

[9], and a severe downregulation of monocyte HLA-DR expression [10]. However, much remains to be understood in order to clarify our vision of this complex and multiparameter pathophysiologic process.

Programmed death-1 (PD-1)-related molecules constitute a complex system of negative regulators involved in controlling T-cell responses. This system is composed of PD-1 (CD279) and its two ligands, PD-L1 (B7-H1, CD274) and PD-L2 (B7-DC, CD273). These molecules belong to the B7:CD28 family [11]. They are best understood relative to their role in viral infections and oncology [11-14]. It has been proposed that pathogens and tumor cells may take advantage of this pathway to escape the host's immune defenses. Considering their immunoregulatory properties, we postulated that the PD-1 system could participate in sepsis-induced immune dysfunctions. Indeed, it was recently shown that PD-1 knockout mice exhibited not only a greater capacity to clear bacteria but, more importantly, a lower mortality in response to experimental sepsis [15]. Therefore, the objective of this study was to investigate the PD-1 system in patients with septic shock.

Materials and methods

Patients

After Hospices Civils de Lyon (Lyon, France) ethics committee review and approval, we enrolled 64 patients with septic shock in this observational clinical study (from 2007 to 2009). Septic shock was diagnosed according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [16]. Patients were admitted to one of the two intensive care units (ICUs) (one medical, the other surgical) of the Lyon-Sud University Hospital (France).

Septic shock was defined by an identifiable site of infection, which was evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: (a) temperature of greater than 38°C or less than 36°C, (b) heart rate of greater than 90 beats per minute, (c) respiratory rate of greater than 20 breaths per minute, and (d) white blood cell count of greater than 12,000 or less than 4,000/mm³ and hypotension persisting despite fluid resuscitation and requiring vasopressor therapy. The beginning of vasopressor therapy was considered the time of diagnosis of septic shock. Exclusion criteria were age of less than 18 years and the absence of circulating leukocytes for flow cytometry phenotyping. No patients with HIV were included. Patients with cancer were excluded from our study if they presented with an aplasia (defined by a polymorphonuclear neutrophil count of less than 0.5 G/L) or were treated with a high dose of corticoids (estimated as treatment superior to 10 mg equivalent prednisolone/

day or more than 700 mg equivalent prednisolone accrued the first day of inclusion) or both.

The following clinical and biological data were collected: demographic characteristics (age and gender), admission category (elective or emergency surgery and medicine), referral pattern (community-, hospital-, or ICU-acquired septic shock), microbiological findings, clinical scores (Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II) and sepsis-related organ failure assessment (SOFA) score), incidence of secondary nosocomial infections (defined as microbiologically documented pulmonary infection, urinary tract infection, bloodstream infection, and catheter-related infection that occurred 48 hours after ICU admission and up to ICU discharge [17]), and the outcome after 28 days (death or survival).

The protocol was reviewed by the institutional ethics committee, which waived the need for informed consent because the study was observational and involved sampling of very small quantities of blood. The purpose of the study was explained to the patients or members of their families. Samples were collected from residual blood after completion of routine follow-up. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-anti-coagulated blood was collected from patients at different time points: day (D) 1-2, D3-5, and D6-10 after diagnosis of septic shock. Additionally, 13 trauma patients were included in the study within the first 48 hours of admission. Inclusion criteria were trauma, age of at least 18 years, and an initial injury severity score (ISS) of at least 25. Finally, 49 healthy volunteers from laboratory staff of our hospital were included as controls.

Flow cytometry reagents

The following antibodies were used: PC5-labeled anti-CD4, PC5-labeled anti-CD8, PC5-labeled anti-CD14, PC5-labeled anti-CD25, PE-labeled anti-CD127, FITC-labeled anti-CD14, ECD-labeled anti-CD4 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA), and PE-labeled anti-HLA-DR or its isotype PE-labeled IgG2a (Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA), PE-labeled anti-human CD249 (PD-1, clone MIH4), FITC-labeled anti-human CD274 (PD-L1, clone MIH1), or PE-labeled anti-human CD273 (PD-L2, clone MIH18) (BD Biosciences). Red blood cells were lysed using the automated TQ-Prep (Beckman Coulter) or using FACS-lysing solution (BD Biosciences). Samples were run on FC500 (Beckman Coulter) and analyzed using CXP software (Beckman Coulter).

Plasma cytokine measurements

IL-10 concentration in patients' plasma samples was measured by Bio-Plex Pro Assays (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Unknown sample values presented

as picograms per milliliter were determined against human standards as described by the manufacturer.

Cell isolation, culture conditions, and cell proliferation assay

In brief, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll density gradient centrifugation (PAA Laboratories, Pasching, Austria). PBMCs were washed three times in phosphate-buffered saline (bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, France) and resuspended in complete medium - that is, RPMI supplemented with HEPES (25 mM), sodium bicarbonate (2 g/L) (Eurobio Laboratories, Les Ulis, France), 10% human serum AB (obtained from a pool of healthy volunteers), 2 mM L-glutamine (Lonza, Verviers, Belgium), 20 UI/mL penicillin, 20 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 2.5 µg/mL Amphotericin B (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ, USA). Cells were kept on ice until stainings or cell cultures were performed.

PBMCs were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL (50,000 cells/well, 100 µL) in flat-bottom 96-well microtiter plates and were stimulated with 5 µg/mL phytohemagglutinin (PHA) (Remel, part of Thermo Fisher Scientific, Lenexa, KS, USA). Cells were incubated 48 hours at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

[methyl-³H]-Thymidine (20 µCi/mL) (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) was added 24 hours before harvesting cells on fiberglass filters by means of an automated cell harvester (PerkinElmer). Incorporated radioactivity was measured in a direct beta counter (PerkinElmer). Assays were carried out in triplicate.

Data analysis and statistics

Patients' clinical and biological parameters were presented as frequencies, percentages, medians, and interquartile ranges (IQRs). Differences in expression levels were calculated using the Mann-Whitney *U* test or, when multiple comparisons were performed, the Friedman test. Correlations were calculated using the Spearman rank test. *P* values of not more than 0.05 were considered statistically significant; if necessary, correction for the number of tests was performed. Statistical analysis was performed using SPSS software (version 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Clinical characteristics of the patient population

Sixty-four patients with septic shock (20 women and 44 men) were included in the study. Their clinical characteristics are shown in Table 1. Median age at admission was 63 years (IQR 54 to 73). Median values for SAPS II and SOFA score at diagnosis of shock were 53 (IQR 39 to 64) and 10 (IQR 8 to 12), respectively, indicating a

Table 1 Clinical characteristics of the patients with septic shock

Parameters	Patients with septic shock (n = 64)
Age at admission, years	63 (54-73)
Males, number (percentage)	44 (68.8)
SAPS II at diagnosis of shock	53 (39-64)
Main admission category, number (percentage)	
Medical	25 (39.1)
Surgery + trauma	39 (60.9)
Comorbidities, number (percentage) of patients	
None	35 (54.7)
One or more	29 (45.3)
SOFA score at diagnosis of shock	10 (8-12)
28-day non-survivors, number (percentage)	11 (17.2)
Infection, number (percentage)	
Diagnosis	
Radiology	10 (15.6)
Surgery	7 (10.9)
Microbiologically documented	
Bacilli Gram-negative	26 (40.6)
Cocci Gram-positive	30 (46.9)
Fungi	8 (12.5)
Type of infection	
Community-acquired	38 (59.4)
Nosocomial	26 (40.6)
Site of infection	
Pulmonary	21 (32.8)
Abdominal	27 (42.2)
Others	16 (25)
Secondary nosocomial infections, number (percentage)	19 (29.7)
Immunological parameters	
Percentage mHLA-DR ^a	45.5 (29.5-69.5)
CD4 ⁺ T-cell counts, cells/µL ^a	319 (226-681)
Percentage of regulatory T cells ^a	8.5 (6.1-11.2)

Values are presented as median and interquartile range (IQR) for continuous variables or as number of cases and percentage for categorical data.

^aMeasured at day 3 to 5 after the onset of septic shock. CD4⁺ T-cell counts were measured in 41 patients with septic shock, and percentage of regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) was measured in 42 patients. mHLA-DR, monocyte HLA-DR; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II; SOFA, sepsis-related organ failure assessment.

high level of severity. Approximately 30% of patients developed secondary nosocomial infections, and 28-day mortality was 17%.

Septic patients presented with typical features of sepsis-induced immunosuppression and displayed a reduced monocyte HLA-DR expression at D3-5 (median value 45.5%, IQR 29.5 to 69.5) in comparison with control values (>90% [18]). Median CD4⁺ T-cell count was also decreased in patients in comparison with healthy

volunteers (319 cells/ μ L (IQR 226 to 681) versus 822 cells/ μ L (IQR 679 to 1,075), respectively; $P < 0.001$), whereas percentage of circulating regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T lymphocytes) was augmented (8.5% (IQR 6.1% to 11.2%) versus 6.2% (IQR 5.2% to 7.6%), respectively; $P = 0.001$).

Thirteen trauma patients (9 men and 4 women) were also included in the study. Median age at admission was 34 years (IQR 24 to 56). In the first 24 hours of admission, they presented a median ISS of 32 (IQR 26 to 34) and a median SAPS II of 39 (IQR 22 to 52).

PD-1-related molecule expression in patients with septic shock

PD-1, PD-L1, and PD-L2 expressions were measured on circulating CD4⁺ lymphocytes, CD8⁺ lymphocytes (PD-1 only), and monocytes at D1-2 and 3-5 after the onset of septic shock. Results for CD4⁺ lymphocytes and monocytes are shown in Figure 1.

The percentages of circulating monocytes expressing PD-1, PD-L1, or PD-L2 were markedly increased in patients with septic shock in comparison with healthy volunteers during the overall monitoring (Figure 1a). This augmentation was present for PD-1 (median control values: 5.0% versus 18.6% (D1-2) and 17.8% (D3-5) in patients; $P < 0.001$), for PD-L1 (control values: 10.2% versus 46.6% (D1-2) and 34.9% (D3-5) in patients; $P < 0.001$), and for PD-L2 (control values: 2.6% versus 8.7% (D1-2) and 8.5% (D3-5) in patients; $P < 0.001$). Similar results were observed when flow cytometry data were expressed as mean fluorescence intensity (MFI) (Table 2). In trauma patients, PD-1-related molecule expressions on monocytes were significantly increased in comparison with healthy individuals (for PD-1: control value: 5.0% versus 9.6%, $P = 0.005$; for PD-L1: control value: 10.2% versus 40.1%, $P < 0.001$; and for PD-L2: control value: 2.6% versus 7.2%, $P < 0.001$). However, PD-1 expression on monocytes was significantly lower in trauma than in septic shock patients at D1-2 (9.6% versus 18.6%, respectively; $P = 0.008$) (data not shown).

Likewise, the percentages of circulating CD4⁺ lymphocytes expressing PD-1 or PD-L1 were notably increased in patients with septic shock in comparison with healthy volunteers during the overall monitoring (for PD-1: control values: 5.4% versus 15.0% (D1-2) and 13.6% (D3-5), $P < 0.001$; for PD-L1: control values: 2.5% versus 3.9% (D1-2; $P = 0.002$) and 3.6% (D3-5; $P = 0.016$) in patients) (Figure 1b). Alternatively, no significant differences were observed between patients and healthy volunteers for percentages of CD4⁺ cells expressing PD-L2 (Figure 1b) or of CD8⁺ lymphocytes positive for PD-1 (Table 2). Once again, similar results were observed when flow cytometry results were expressed as MFI (Table 2). No difference in PD-1-related molecule

expressions was observed between trauma patients and healthy individuals. However, the percentage of PD-1 expressing CD4⁺ cells was significantly lower in trauma than in septic shock patients at D1-2 (5.2% versus 15.0%, respectively; $P < 0.001$) (data not shown).

Of note, there was no variation of PD-1-related molecule expressions in regard to age or gender either in healthy subjects or in patients with septic shock. Indeed, we did not observe significant correlations between PD-1-related molecule expressions and the age of septic shock patients ($r = 0.21$, $P = 0.12$ for PD-1 expression on CD4⁺ lymphocytes; $r = 0.04$, $P = 0.78$ for PD-L1 expression on monocytes) or of healthy volunteers ($r = 0.10$, $P = 0.49$ for PD-1 expression on CD4⁺ lymphocytes; $r = -0.15$, $P = 0.30$ for PD-L1 expression on monocytes).

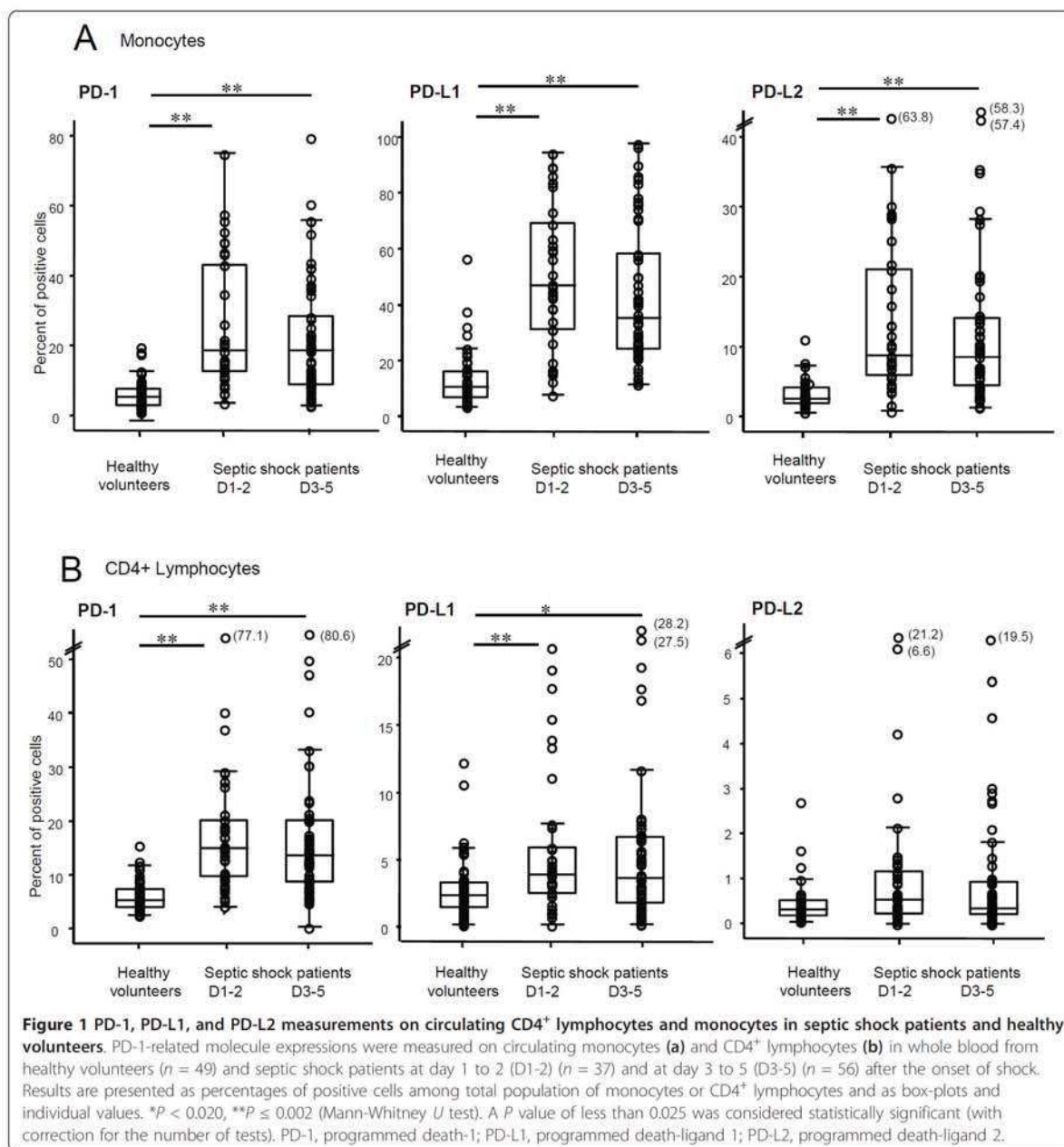
Finally, in 10 patients with septic shock, sequential blood samples were obtained at D1-2, D3-5, and D6-10 after the onset of shock. During this period, no significant variations over time in regard to PD-1 molecule expressions either on monocytes or on lymphocytes were observed (Figure 2).

Association between PD-1-related molecule expressions and clinical parameters

To assess the clinical relevance of the increase in PD-1-related molecule expressions after septic shock, flow cytometric measurements were correlated with clinical parameters and usual biomarkers of sepsis-induced immunosuppression. No significant correlations were found between PD-1-related molecule expressions and percentages of HLA-DR expressing monocytes, CD4⁺ lymphocyte count, percentage of circulating regulatory T cells, or severity scores calculated at the onset of shock (SAPS II or SOFA score) (data not shown). However, at D1-2, we observed that PD-L1 expression on monocytes was significantly higher in non-survivors in comparison with survivors (Figure 3a). Moreover, at D3-5, patients who went on to develop a secondary nosocomial infection presented with higher PD-1 (Figure 3b) and PD-L2 (Figure 3c) expressions on their blood monocytes in comparison with those who remained free of any secondary nosocomial episode.

Correlation between plasma IL-10 concentration and PD-1-related molecule expression in patients with septic shock

Increased circulating IL-10 concentration has been linked with mortality after septic shock [19] and recently with enhanced PD-1 expression in HIV-infected patients [20]. We thus measured circulating IL-10 levels in 29 septic shock patients for whom plasma samples were available and we correlated this parameter with leukocyte PD-1/PD-L expressions. Not surprisingly, we observed that



non-survivors exhibited higher plasma IL-10 concentration than survivors at D1-2 and D3-5 ($P = 0.01$ for both) (Figure 4a). Interestingly, a significant positive correlation was measured between PD-1 monocyte expression and plasma IL-10 concentration in patients at D1-2 ($r = 0.49$; $P = 0.007$) (Figure 4b) but not at D3-5 (data not shown). In addition, significant correlations were observed between both PD-L1 or PD-L2 monocyte expressions and increased plasma IL-10 concentration at D1-2 ($r = 0.58$;

$P = 0.001$ and $r = 0.45$; $P = 0.014$, respectively) and D3-5 ($r = 0.45$; $P = 0.015$ and $r = 0.53$; $P = 0.003$, respectively) (Figure 4c, d). Of note, no correlations were found between PD-1/PD-L-related molecule expressions on CD4⁺ lymphocytes and changes in plasma IL-10 concentration (data not shown). Also, for all of these observations made for percentage of positive cells, similar correlations were obtained when flow cytometry results were expressed as MFI (data not shown).

Table 2 PD-1-related molecule expressions as mean of fluorescence intensity on leukocytes in septic shock patients and healthy volunteers

		CD4 ⁺ T cells			CD8 ⁺ T cells		Monocytes	
		PD-1	PD-L1	PD-L2	PD-1	PD-1	PD-L1	PD-L2
Healthy volunteers	Median	8.7	11.5	4.9	13.6	12.3	16.9	8.9
	IQR	(7.8-10.5)	(10.1-12.0)	(4.5-5.6)	(11.1-20.4)	(10.1-15.8)	(15.3-18.2)	(7.7-9.8)
	Median	13.1	11.4	6.0	18.1	17.4	22.0	11.6
Day 1-2	IQR	(11.4-19.7)	(9.8-14.3)	(4.8-7.1)	(13.6-24.4)	(14.6-24.0)	(19.3-31.8)	(9.9-13.6)
	<i>P</i> value	<0.001	0.150	0.009	0.213	<0.001	<0.001	<0.001
	Median	12.2	11.4	5.4	17.5	16.2	21.1	11.1
Day 3-5	IQR	(10.8-15.7)	(10.0-13.5)	(4.4-7.1)	(11.8-22.3)	(13.0-20.4)	(18.2-28.0)	(9.6-13.3)
	<i>P</i> value	<0.001	0.289	0.232	0.306	<0.001	<0.001	<0.001

Programmed death-1 (PD-1)-related molecule expressions were measured on circulating CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes and monocytes in whole blood from healthy volunteers (*n* = 49) and septic shock patients at day 1 to 2 (*n* = 37) and at day 3 to 5 (*n* = 56) after the onset of shock. Results are presented as mean fluorescence intensity. A *P* value of less than 0.025 was considered statistically significant, and correction for the number of tests was performed (Mann-Whitney *U* test). IQR, interquartile range.

Decreased lymphocyte proliferation after septic shock

In an attempt to begin to address the biological significance of these changes in PD-1 expression to the development of sepsis-induced lymphocyte dysfunction, freshly isolated PBMCs from septic shock patients and healthy volunteers were assessed for their capacity to respond to PHA. As expected, we observed that lymphocyte proliferation was significantly reduced in patients in comparison with healthy volunteers (*P* < 0.001) (Figure 5a). Interestingly, in patients, a significant negative correlation was observed between this reduced proliferation and PD-1 (*r* = -0.81 with *P* = 0.003) (Figure 5b) or PD-L1 (*r* = -0.63 with *P* = 0.039) (data not shown) overexpression on circulating CD4⁺ lymphocytes. Similar results were obtained when PD-1 and PD-L1 staining was expressed as MFI (*r* = -0.80 with *P* = 0.003 and *r* = -0.63 with *P* = 0.038, respectively).

Discussion

PD-1 and its ligands, PD-L1 and PD-L2, belong to the B7-CD28 family of molecules [11]. Co-ligation of T-cell receptor with the PD-1 system is thought to induce an inhibitory signal in T cells characterized by cell cycle arrest, inability to proliferate, and reduced cytokine synthesis (interferon-gamma (IFN-γ) or IL-2 or both [21-24]). The co-inhibitory PD-1 system has been studied mainly in viral diseases and oncology. This system may be used by viral pathogens or cancer cells to evade the host's immune response [11]. Of note, in virus-infected patients, CD8⁺ T cells overexpressing PD-1 (in comparison with healthy volunteers) exhibit a so-called 'exhaustion profile' as they produced less IFN-γ following antigen stimulation, had reduced cytotoxic activity, and had decreased proliferation in response to specific antigens [25-27].

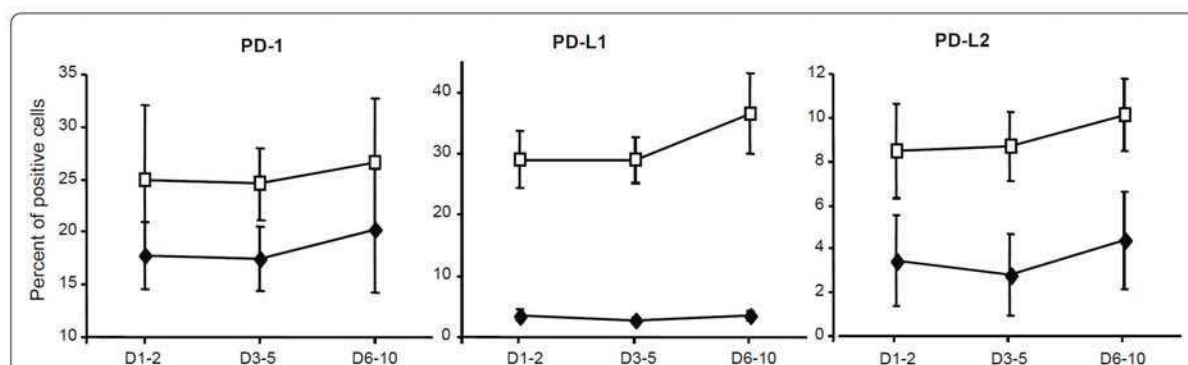
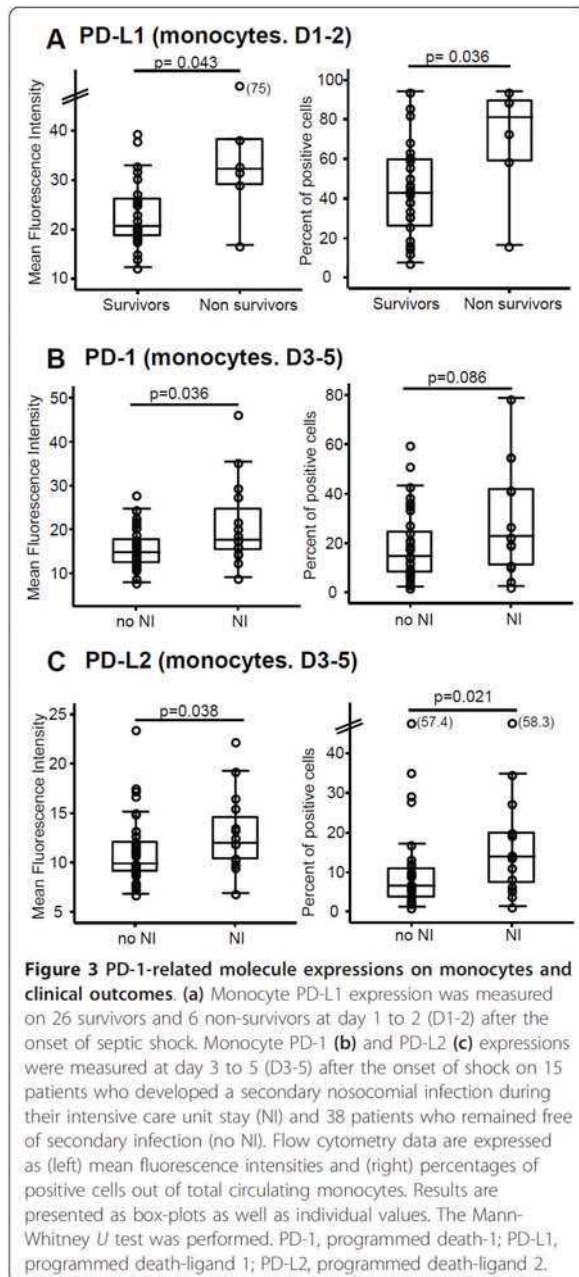


Figure 2 Sequential PD-1, PD-L1, and PD-L2 measurements on circulating CD4⁺ lymphocytes and monocytes in patients with septic shock. In 10 patients with septic shock, sequential blood samples were obtained at day 1 to 2 (D1-2), day 3 to 5 (D3-5), and day 6 to 10 (D6-10) after the onset of shock, and percentages of PD-1-, PD-L1-, and PD-L2-positive CD4⁺ lymphocytes (black diamonds) and monocytes (white squares) were measured by flow cytometry. Results are expressed as mean ± standard error of the mean. The Friedman test was performed: *P* values were greater than 0.05 for all of the analyses. PD-1, programmed death-1; PD-L1, programmed death-ligand 1; PD-L2, programmed death-ligand 2.



Interestingly, we demonstrated here for the first time that typical sepsis-immune dysfunctions such as decreased monocyte HLA-DR expression, decreased circulating CD4⁺ T-cell count, and increased percentage of regulatory T cells [6] were associated with an increased PD-1 expression on CD4⁺ lymphocytes (and PD-L1 to a lesser extent) and increased PD-1, PD-L1, and PD-L2 expressions on monocytes. Of note, during the review of

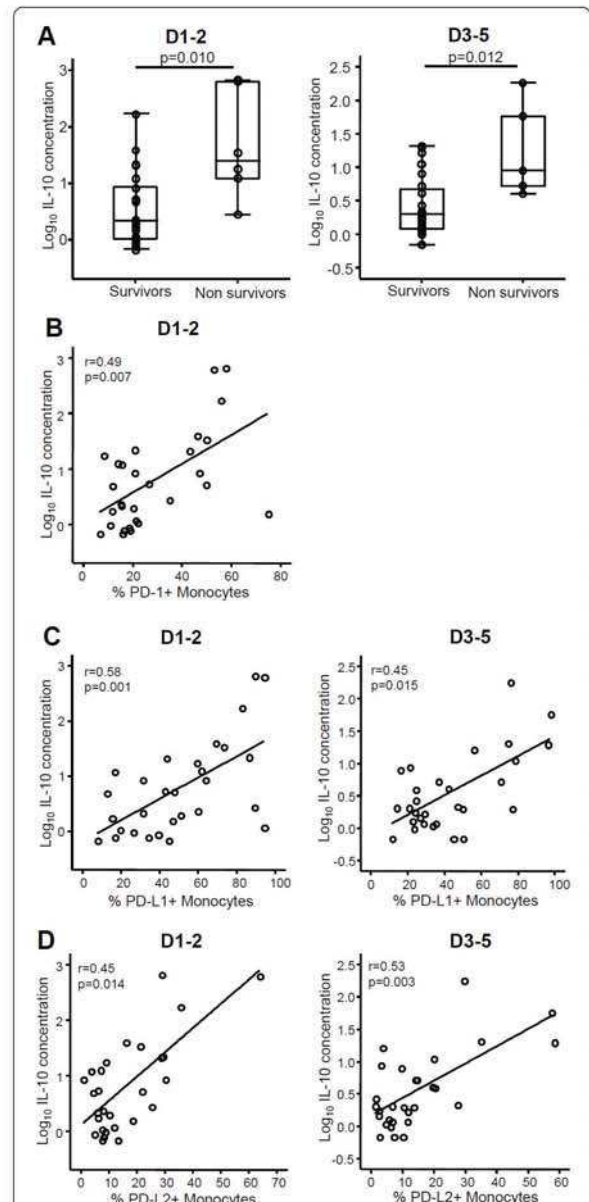
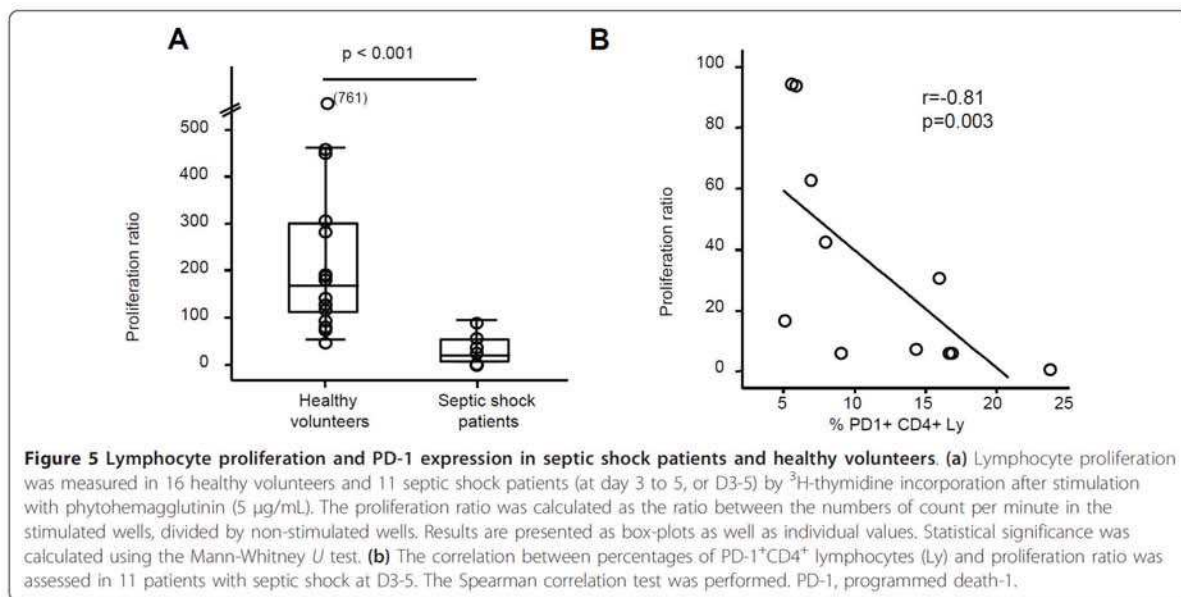


Figure 4 Plasma IL-10 concentration and PD-1 expression in patients with septic shock. (a) Plasma IL-10 concentration was measured in survivors and non-survivors at day 1 to 2 (D1-2) ($n = 23$ and $n = 6$, respectively) and at day 3 to 5 (D3-5) ($n = 24$ and $n = 5$, respectively) after septic shock. Results are presented as box-plots and as individual values, and horizontal lines represent medians. The Mann-Whitney *U* test was performed. (b-d) Correlations between increased plasma IL-10 concentration and increased PD-1 (b), PD-L1 (c), and PD-L2 (d) expressions on monocytes were calculated at D1-2 and D3-5 in 29 patients with septic shock. The Spearman correlation test was used to assess statistical significance. IL-10, interleukin-10; PD-1, programmed death-1; PD-L1, programmed death-ligand 1; PD-L2, programmed death-ligand 2.



this article, a study including 19 patients with septic shock confirmed that PD-1 expression on CD4⁺ lymphocytes and PD-L1 expression on monocytes were elevated in comparison with healthy volunteers [28]. Moreover, we observed a significant inverse correlation between increased PD-1 and PD-L1 CD4⁺ lymphocyte expressions and decreased PHA-induced lymphocyte proliferation in patients with septic shock. Such inverse correlations have been described in patients with hepatitis B [29] and in patients with HIV [14]. Additionally, we observed a significant correlation between increased plasma IL-10 concentration and increased PD-1-related molecule expressions on monocytes from patients with septic shock. Recently, in an HIV-infected patient cohort, such a correlation was described and implicated in the reduced CD4⁺ T-cell proliferation observed in these patients [20]. In accordance with these observations, we recently showed not only that the increased septic blood levels of IL-10 are reduced but also that the rise in lipopolysaccharide-induced IL-10 release by septic mouse macrophages is lost in animals that are genetically deficient (knockout) in functional PD-1 [15]. Overall, our results therefore suggest a link between increased PD-1-related molecule expressions and the development of sepsis-induced immune dysfunctions.

Surprisingly, we found no PD-1 overexpression on circulating CD8⁺ T cells in septic patients. This is divergent from the observations made in patients with HIV, hepatitis B virus, or hepatitis C virus [13,25,26,29]. One explanation may be that CD8⁺ cells, which play a prominent role in viral infections, may be less central to the response patients make to septic shock. This is because

this response is thought mainly to be a response to a bacterial challenge. Of note, Zhang and colleagues [28] recently described an increased PD-1 expression on CD8⁺ lymphocytes in a small cohort of 19 septic shock patients in comparison with healthy volunteers. Thus, this observation deserves to be further examined in a larger cohort of septic patients.

Of note, in our cohort, non-survivors displayed higher monocyte PD-L1 expression in comparison with survivors, and patients who went on to develop secondary nosocomial infections had significantly higher PD-1 and PD-L2 monocyte expressions in comparison with patients who remained free of secondary infection. This is consistent with data observed in a murine model of sepsis, in which after the induction of polymicrobial septic shock by cecal ligation and puncture (CLP), PD-1 knockout mice showed a markedly improved capacity to clear bacteria, both at the local (peritoneal lavage) and the systemic (blood) level, in comparison with wild-type mice [15]. Moreover, PD-L1 blockade significantly improved survival, prevented sepsis-induced depletion of lymphocytes, increased tumor necrosis factor-alpha and IL-6 productions, decreased IL-10 production, and enhanced bacterial clearance in mice after CLP [30]. Similar data were recently observed *ex vivo* in patients with septic shock [28]. Importantly, we show here that the PD-1 system not only may play a role in immune dysfunction but also may be an indicator of septic mortality and subsequent infectious episodes in septic patients.

Increased expressions of co-inhibitory as well as decreased expressions of co-stimulatory members of the

B7-CD28 family of molecules have been described in ICU patients. In trauma patients, CTLA-4 and PD-1 expressions were elevated in anergic T cells [31]. Similar results were observed at the mRNA level in trauma patients with multiple organ dysfunction syndrome [32]. In mice, it was recently shown that B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA) (another co-inhibitory molecule) was induced at the early phase of *Listeria monocytogenes* infection [33]. Moreover, CD3 expression on T lymphocytes was reduced in septic shock patients in comparison with healthy volunteers [34]. Similar decreased expression was observed at the mRNA level in patients developing sepsis or severe sepsis postoperatively [35] and in trauma patients [36]. Finally, CD28 expression (delivering a positive co-signal after ligation to B7.1 or B7.2) was depressed in trauma patients' anergic T cells and may contribute to incomplete activation of these cells [36]. In total, these alterations may play a major role in lymphocyte anergy that has been observed in ICU patients and that has been associated with increased mortality and risk of nosocomial infections. They could thus represent potential therapeutic targets and associated markers to guide future immunotherapeutic decisions [37].

The present study has some limitations. We could not address the involvement of the PD-1 system in sepsis-induced apoptosis. Indeed, PD-1 was first described as being implicated in programmed cell death [38]. It was also recently described that PD-1⁺CD8⁺ T cells were more sensitive to both spontaneous and Fas-induced apoptosis in comparison with PD-1⁻CD8⁺ T cells [14]. Most interestingly, it has recently been reported that *in vivo* blockade of PD-1 could decrease T- and B-cell apoptosis and improve survival in CLP-induced septic mice [39]. However, given the technical difficulties encountered in the measurement of apoptosis in clinical samples, let alone in those of minimal-volume septic shock patients' whole blood samples that are already dedicated to numerous assays [40], this aspect could not be specifically addressed here and thus deserves to be investigated in studies specifically dedicated to examining that process/index.

Conclusions

We describe here for the first time that PD-1/PD-L-related molecule expression is markedly induced on circulating cells of patients with septic shock. Moreover, increased PD-1-related molecule expression appears to be correlated with the development of immune dysfunctions, secondary nosocomial infections, and death. We believe that, although these findings need to be confirmed in a larger multicentered clinical study, our results are in line with the recent commentary of Hotchkiss and Opal [37], which proposes the use of

anti-PD-1 blocking antibodies in septic patients given that these molecules are already being tested (and well tolerated) in clinical trials in patients with cancer. Although this hypothesis remains a speculation at the moment and further functional studies are required to understand the mechanism of action of PD-1-related molecules in patients with septic shock, the PD-1 family of receptor and ligands could represent a potential innovative therapeutic strategy with which to restore immune functions and may further alter morbidity/mortality seen with sepsis, and this is in line with the concept of tailored immunotherapy [41]. Through their changing expression (alone or together with other markers), PD-1 molecules could give us insight into the immune status of the septic individual as well as their possible responsiveness to various established or novel therapeutic approaches (or both) used in these critically ill patients.

Key messages

- Programmed death-1 (PD-1)-related molecule expressions are increased on circulating monocytes and CD4⁺ lymphocytes after septic shock in comparison with healthy volunteers and trauma patients.
- Increased PD-1-related molecule expressions on monocytes are significantly associated with increased mortality and occurrence of secondary nosocomial infections after septic shock.
- Augmented PD-1-related molecule expressions after septic shock are associated with immune dysfunctions such as decreased mitogen-induced lymphocyte proliferation and increased circulating interleukin-10 concentration.

Abbreviations

CLP: cecal ligation and puncture; D: day; ICU: intensive care unit; IFN- γ : interferon-gamma; IL: interleukin; IQR: interquartile range; ISS: injury severity score; MF: mean fluorescence intensity; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; PD-1: programmed death-1; PD-L1: programmed death-ligand 1; PD-L2: programmed death-ligand 2; PHA: phytohemagglutinin; SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II; SOFA: sepsis-related organ failure assessment.

Acknowledgements

We would like to thank Hélène Thizy, Marion Provent, Carmen Fernandez, and Anne Portier for technical assistance and Nicolas Voirin for his fruitful advice on statistical analysis.

This research was supported by funds from the Hospices Civils de Lyon, by DHOS-Inserm 'Recherche Clinique Translationnelle 2009' (to GM and FG), by Fondation Innovation en Infectiologie (FINOVI) (to GM and FV), by the French Ministry of Health (PHRC 2008) (to GM and AL), and by US National Institutes of Health grants R01s GM46354 and GM53209 (to AA).

Author details

¹Hospices Civils de Lyon, Hôpital E. Herriot, Laboratoire d'Immunologie, 5 Place d'Arsonval, 69003 Lyon, France. ²Hospices Civils de Lyon, CH Lyon-Sud, Service de Réanimation, Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre-Bénite, France. ³Division of Surgical Research, Department of Surgery, Brown University School of Medicine/Rhode Island Hospital, 593 Eddy Street,

Providence, RI 02903, USA. ⁴Hospices Civils de Lyon, CH Lyon-Sud, Laboratoire d'Immunologie, Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre-Bénite, France. ⁵Hospices Civils de Lyon, Hôpital E. Herriot, Service de Réanimation, 5 Place d'Arsonval, 69003 Lyon, France. ⁶Hospices Civils de Lyon/INSERM, Centre d'Investigation Clinique (CIC 0201), 52, Boulevard Pinel, 69003 Lyon, France.

Authors' contributions

CG, FV, GM, and AL designed the study, collected clinical information, analyzed raw data, performed statistical analysis, and contributed to writing the paper. HK, FP, CM, and LD performed the immunological monitoring. AA, FG, and XH designed the study and contributed to writing the paper. AC and BA collected clinical information about trauma patients. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 26 January 2011 Revised: 3 March 2011

Accepted: 21 March 2011 Published: 21 March 2011

References

- Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003, **348**:138-150.
- Dombrowski YY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007, **35**:1244-1250.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001, **29**:1303-1310.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006, **34**:344-353.
- Munford RS, Pugin J: Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**:316-321.
- Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A: Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 2008, **14**:64-78.
- Cavaillon JM, Adib-Conquy M: Bench-to bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 2006, **10**:233.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001, **166**:6952-6963.
- Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G: Increased circulating regulatory T cells (CD4+)CD25 (+)CD127 (-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009, **35**:678-686.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P: Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006, **32**:1175-1183.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH: PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008, **26**:677-704.
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD: PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006, **443**:350-354.
- Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP: Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006, **12**:1198-1202.
- Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, Precopio ML, Schacker T, Roederer M, Douek DC, Koup RA: PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006, **203**:2281-2292.
- Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, Swan R, Kherouf H, Monneret G, Chung CS, Ayala A: PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:6303-6308.
- Bone RC: Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 1992, **268**:3452-3455.
- Landelle C, Lepape A, Francois A, Tognet E, Thizy H, Voirin N, Timsit JF, Monneret G, Vanhems P: Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008, **29**:1054-1065.
- Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard AL, Gutowski MC, Bienvenu J, Lepape A: Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem* 2002, **48**:1589-1592.
- Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A: The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 2004, **95**:193-198.
- Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, Hill BJ, Noto A, Ancuta P, Peretz Y, Fonseca SG, Van Grevenynghe J, Boulassel MR, Bruneau J, Shoukry NH, Routy JP, Douek DC, Haddad EK, Sekaly RP: Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med* 2010, **16**:452-459.
- Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Bousiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ: PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001, **2**:261-268.
- Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM: PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4 (+) and CD8 (+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 2002, **32**:634-643.
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000, **192**:1027-1034.
- Chernitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL: SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 2004, **173**:945-954.
- Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR: Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 2007, **81**:9249-9258.
- Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M, Shaked A, Olthoff K, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM: Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 2008, **134**:1927-1937, 1937 e1921-1922.
- Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, Chen L, Zhang H, Wei J, Jin L, Shi M, Gao GF, Wu H, Wang FS: PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 2007, **109**:4671-4678.
- Zhang Y, Li J, Lou J, Zhou Y, Bo L, Zhu J, Zhu K, Wan X, Cai Z, Deng X: Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care* 2011, **15**:R70.
- Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z: PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol* 2008, **45**:963-970.
- Zhang Y, Zhou Y, Lou J, Li J, Bo L, Zhu K, Wan X, Deng X, Cai Z: PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit Care* 2010, **14**:R220.
- Bandyopadhyay G, De A, Laudanski K, Li F, Lentz C, Bankey P, Miller-Graziano C: Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. *Crit Care Med* 2007, **35**:794-801.

32. Laudanski K, Miller-Graziano C, Xiao W, Mindrinos MN, Richards DR, De A, Moldawer LL, Maier RV, Bankey P, Baker HV, Brownstein BH, Cobb JP, Calvano SE, Davis RW, Tompkins RG: **Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:15564-15569.
33. Sun Y, Brown NK, Ruddy MJ, Miller ML, Lee Y, Wang Y, Murphy KM, Pfeffer K, Chen L, Kaye J, Fu YX: **B and T lymphocyte attenuator tempers early infection immunity.** *J Immunol* 2009, **183**:1946-1951.
34. Venet F, Bohe J, Debard AL, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G: **Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock.** *Crit Care Med* 2005, **33**:2836-2840.
35. Hinrichs C, Kotsch K, Buchwald S, Habicher M, Saak N, Gerlach H, Volk HD, Keh D: **Perioperative gene expression analysis for prediction of postoperative sepsis.** *Clin Chem* 2010, **56**:613-622.
36. De AK, Kodys KM, Pellegrini J, Yeh B, Furse RK, Bankey P, Miller-Graziano CL: **Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression.** *Clin Immunol* 2000, **96**:52-66.
37. Hotchkiss RS, Opal S: **Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe.** *N Engl J Med* 2010, **363**:87-89.
38. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T: **Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death.** *EMBO J* 1992, **11**:3887-3895.
39. Brahmamdam P, Inoue S, Unsinger J, Chang KC, McDunn JE, Hotchkiss RS: **Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis.** *J Leukoc Biol* 2010, **88**:233-240.
40. Turrel-Davin F, Guignant C, Lepape A, Mouglin B, Monneret G, Venet F: **Up regulation of the pro-apoptotic genes BID and FAS in septic shock patients.** *Crit Care* 2010, **14**:R133.
41. Goyert SM, Silver J: **Editorial: PD-1, a new target for sepsis treatment: better late than never.** *J Leukoc Biol* 2010, **88**:225-226.

doi:10.1186/cc10112

Cite this article as: Guignant *et al.*: Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Critical Care*. 2011 **15**:R99.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5. Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma

Aurélie Chéron, Bernard Floccard, Bernard Allaouchiche, Caroline Guignant, Françoise Poitevin, Christophe Malcus, Julien Crozon, Alexandre Faure, Christian Guillaume, Guillaume Marcotte, Alexandre Vulliez, Olivier Monneuse, Guillaume Monneret.
Crit Care, 2010; 14(6): R208

Tout comme les patients septiques, les polytraumatisés présentent dans les premières heures après le traumatisme une réponse pro-inflammatoire importante qui est rapidement suivie par une réponse à prédominance anti-inflammatoire. Lorsque celle-ci persiste, elle induit un état d'immunosuppression qui réduit les capacités de défense du système immunitaire. Le biomarqueur le plus étudié dans ce contexte chez les patients de réanimation est l'expression monocyttaire de HLA-DR (HLA-DRm). Dans le cadre de cette étude pilotée par Aurélie Chéron-Gouel (interne en réanimation), nous avons contribué à évaluer l'intérêt de l'expression de HLA-DRm (mesurée par cytométrie en flux selon un protocole standardisé, trois fois au cours de la première semaine d'hospitalisation) pour prédire le risque de développer un sepsis dans une cohorte de 105 polytraumatisés.

Dès le deuxième jour après le traumatisme, tous les patients présentaient une expression réduite de HLA-DRm. Cependant, chez les 37 patients qui ont développé une infection secondaire, cette expression est restée abaissée alors que chez les patients sans infection, l'expression de HLA-DRm a été restaurée progressivement dès le troisième jour après le traumatisme. Dans une analyse multivariée, après ajustement sur les facteurs cliniques confondants, seule la pente d'évolution de l'expression de HLA-DRm entre les deux premiers prélèvements apportait de l'information sur le risque de développer un sepsis.

Cette étude illustre la notion importante de suivi dans le temps d'un biomarqueur. L'information apportée par une évolution temporelle est supérieure à une valeur unique obtenue à un temps donné.

RESEARCH

Open Access

Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma

Aurélie Cheron¹, Bernard Floccard¹, Bernard Allaouchiche¹, Caroline Guignant², Françoise Poitevin², Christophe Malcus², Jullien Crozon¹, Alexandre Faure¹, Christian Guillaume¹, Guillaume Marcotte¹, Alexandre Vulliez¹, Olivier Monneuse³, Guillaume Monneret^{2*}

Abstract

Introduction: Major trauma is characterized by an overwhelming pro-inflammatory response and an accompanying anti-inflammatory response that lead to a state of immunosuppression, as observed after septic shock. Diminished monocyte Human Leukocyte Antigen DR (mHLA-DR) is a reliable marker of monocyte dysfunction and immunosuppression. The main objective of this study was to determine the relation between mHLA-DR expression in severe trauma patients and the development of sepsis.

Methods: We conducted a prospective observational study over 23 months in a trauma intensive care unit at a university hospital. Patients with an Injury Severity Score (ISS) over 25 and age over 18 were included. mHLA-DR was assessed by flow cytometry protocol according to standardized protocol. Mann-Whitney U-test for continuous non-parametric variables, independent paired t test for continuous parametric variables and chi-square test for categorical data were used.

Results: mHLA-DR was measured three times a week during the first 14 days. One hundred five consecutive severely injured patients were monitored (ISS 38 ± 17 , SAPS II 37 ± 16). Thirty-seven patients (35%) developed sepsis over the 14 days post-trauma. At days 1-2, mHLA-DR was diminished in the whole patient population, with no difference with the development of sepsis. At days 3-4, a highly significant difference appeared between septic and non-septic patients. Non-septic patients showed an increase in mHLA-DR levels, whereas septic patients did not ($13,723 \pm 7,766$ versus $9,271 \pm 6,029$ antibodies per cell, $p = .004$). Most importantly, multivariate logistic regression analysis, after adjustment for usual clinical confounders (adjusted OR 5.41, 95% CI 1.42-20.52), revealed that a slope of mHLA-DR expression between days 1-2 and days 3-4 below 1.2 remained associated with the development of sepsis.

Conclusions: Major trauma induced an immunosuppression, characterized by a decrease in mHLA-DR expression. Importantly, after multivariate regression logistic analysis, persistent decreased expression was assessed to be in relation with the development of sepsis. This is the first study in trauma patients showing a link between the lack of immune recovery and the development of sepsis on the basis of the standardized protocol. Monitoring immune function by mHLA-DR measurement could be useful to identify trauma patients at a high risk of infection.

* Correspondence: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

²Hospices Civils de Lyon, Laboratoire d'immunologie cellulaire, Hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval - 69437 Lyon Cedex 03, France
Full list of author information is available at the end of the article

Introduction

The global burden of death and disability due to injuries is increasing, especially in patients younger than 40 years old [1]. In the course of supportive management, injured patients often develop sepsis, which is the most frequent cause of complications and death following severe injury [2]. Immunosuppression has emerged recently as a risk factor for sepsis in trauma patients [3,4]. It is now well established that any situation of injury or stress can induce a systemic inflammatory response that is often followed by an anti-inflammatory response [5-7]. This compensatory feedback mechanism, which maintains inflammatory immune homeostasis, is believed to lower natural defenses against pathogens and contribute to a state of immunosuppression [8-10] and is known to occur in cases of sepsis, septic shock, burns, stroke, and injury and in patients undergoing major surgery. Such alterations might be directly responsible for a detrimental outcome in trauma patients and for lowering the resistance to nosocomial infections in patients who have survived initial resuscitation [7-9,11].

In the absence of specific clinical signs of immune function in intensive care patients, biomarkers of immunosuppression are clearly highly desirable. Diminished expression of human leukocyte antigen DR expression on circulating monocytes (mHLA-DR) is widely accepted as a reliable indicator of immunosuppression in critically ill patients [12-14]. Some work has been devoted to trauma patients, but for the most part, these preliminary studies were performed 10 years ago (that is, before the advent of the last advanced trauma life support [ATLS] protocol for the management of multiple-injury patients). Early findings on mHLA-DR were based on limited numbers of patients and used non-standardized flow cytometry protocols [15-20]. The purpose of this study was to investigate mHLA-DR expression on the basis of the standardized protocol and to assess this expression as a predictive factor of infection in a multivariate analysis.

In the study described here, mHLA-DR expression was measured according to recently established flow cytometry protocols in a group of severely injured patients. The main objective of the study was to assess whether a low mHLA-DR expression might be a good predictor of infection in such patients.

Materials and methods

Patients' inclusion

This prospective observational study was carried out over a 15-month period (July 2008 to September 2009). The protocol was reviewed by the institutional ethics committee, which waived the need for informed consent because the study was observational and involved sampling of very small quantities of blood (100 μ L). The

purpose of the study was explained to the patients or members of their families. Samples were collected from residual blood after completion of routine follow-up.

Inclusion criteria were an Injury Severity Score (ISS) [21,22] of more than 25 and admission to the intensive care unit (ICU). Clinical exclusion criteria were age of less than 18 years, ISS of less than 25, chronic corticosteroid therapy, and death in the first 48 hours after admission. Patients admitted on a Saturday were excluded because mHLA-DR cannot be measured on day 1 or 2 (blood samples were not collected on Saturdays or Sundays, when the laboratory did not operate).

All patients admitted were followed up with prospectively until day 14 by daily clinical examination and biological tests. During follow-up, clinical and biological data were collected. The data collection comprised demographic characteristics (age and gender), infection characteristics (source, microorganisms identified, delay between trauma, and onset of sepsis), and outcome at 28 days (death or survival). Therapeutic data were also collected (a) on admission to the trauma room (the need for inotropic or vasoactive support and blood products [red blood cells, fresh frozen plasma, platelets, and albumin] and their quantities used to sustain a mean arterial pressure [MAP] up to 70 mm Hg [or 90 mm Hg in the case of cranial trauma], and the type and quantity of prophylactic antibiotics) and (b) during support (number of ventilator days, quantity and type of vasoactive support and of blood products, and use of massive transfusion, which was defined as more than 10 units of blood [23] or the replacement of the patient's total blood volume [24] over a 24-hour period). Creatinine, lactate concentration, and abnormal biphasic pulse transmittance waveform (BPW) were measured daily. Three clinical scores were recorded: ISS on admission (range of 0 to 75), initial severity of disease as assessed by the new Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II) (range of 0 to 164) [25], and the Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score (range of 0 to 24) on admission and every day during follow-up [26]. Severe brain and thoracic injury, which are well established as risk factors for sepsis development, were also taken into account [22].

Sepsis definition

The American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference [27] definition of sepsis was used for this study, namely the presence of an identifiable site of infection and evidence of a systemic inflammatory response on the basis of at least two of the following criteria: (a) body temperature of greater than 38°C or of less than 36°C, (b) heart rate of greater than 90 beats per minute, (c) respiratory rate of greater than 20 breaths per minute or

hyperventilation as indicated by an arterial partial pressure of carbon dioxide (PaCO₂) of less than 32 mm Hg (less than 4.3 kPa), and (d) a white blood cell count of greater than 12,000 cells/mm³ or of less than 4,000 cells/mm³ or the presence of more than 10% immature neutrophils. The onset of sepsis was defined, as recommended by the Consensus Conference [27], as the day on which the site of infection was identified. The final diagnosis of sepsis was retrospectively established by two experts assessing the complete medical data and not involved in case management. Diagnoses of pneumonia and urinary infection were established according to the guidelines of the American Thoracic Society and the Infectious Diseases Society of America [28] and of the Centers for Disease Control [29], respectively. Physicians were not informed of mHLA-DR results. BPW was also determined as it may be used as an indicator of sepsis development [30-32].

Blood sampling and flow cytometric analysis

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated blood samples were collected at 8 a.m. every 2 days after injury (on Mondays, Wednesdays, and Fridays) (that is, at days 1 and 2, days 3 and 4, days 5 and 6, days 7 and 8, days 9 and 10, and days 11 and 12). Flow cytometric (EPICS XL; Beckman Coulter, Inc., Hialeah, FL, USA) expression of monocyte HLA-DR was assessed on arterial, venous, or capillary blood. Blood samples were stored immediately at 4°C and stained within 2 hours after collection, in accordance with the standardization recommendations for mHLA-DR measurement [33,34]. Staining and cell acquisition were undertaken as described in the European standardized protocol. Monoclonal antibodies and their respective isotype controls were used according to the manufacturers' recommendations: fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD14 (10 µL; Immunotech, Marseille France) and phycoerythrin (PE)-labeled anti-HLA-DR (20 µL; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) per 100 µL of whole blood. Monocytes were characterized on the basis of their CD14 expression. Results were expressed as the number of anti-HLA-DR antibodies per cell (AB/C) (normal >15,000), which is correlated with the number of HLA-DR molecules expressed on each monocyte [33].

Because sepsis alone can amplify a drop in mHLA-DR expression, mHLA-DR expression data were excluded from the analysis after the onset of sepsis, thereby precluding calculation of a difference in mHLA-DR expression between septic and non-septic patients at days 7 and 8, 9 and 10, and 11 and 12 (because of insufficient numbers of values for statistical analysis).

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify all data for normality. Baseline characteristics were described by frequency, median and interquartile range (IQR), or (where appropriate) mean ± standard deviation. Patients were separated into two groups: those who developed sepsis and those who did not. The groups were compared using the Mann-Whitney *U* test for continuous non-parametric variables, the independent paired *t* test for continuous parametric variables, and the chi-square test for categorical data. mHLA-DR expression was stratified according to the best threshold chosen using the Youden index. Receiver operating characteristic (ROC) curves and the areas under the curve were calculated for the slope in mHLA-DR between days 1 and 2 and days 3 and 4. Univariate and multivariate logistic regression analyses were used to identify variables associated with the risk of infection and assessed by odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). A *P* value of less than 0.05 was taken as the significance level. The Bonferroni correction was used to avoid spurious results from the multiple statistical tests performed simultaneously. The alpha values for three or six tests were 0.016 and 0.008, respectively. MedCalc software version 9.6.4.0 (MedCalc Software bvba, Mariakerke, Belgium) was used to perform the statistical analyses.

Results

Patients' characteristics

A total of 536 consecutive patients in the early stages of trauma were admitted to the trauma room between July 2008 and May 2010. One hundred five of these patients met the inclusion criteria of the study (Figure 1). One hundred thirty patients were excluded because they had

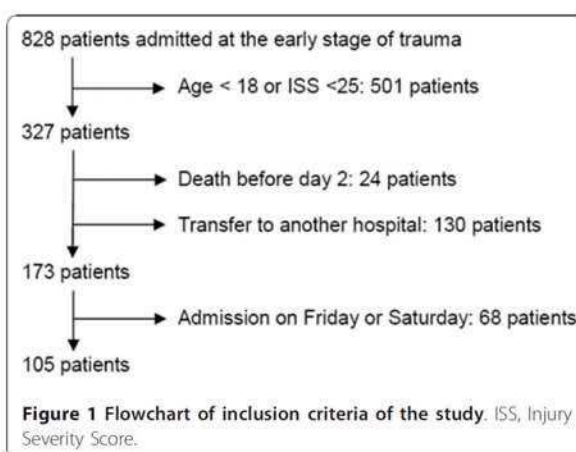


Figure 1 Flowchart of inclusion criteria of the study. ISS, Injury Severity Score.

Table 1 Clinical patients' characteristics

Parameters	Overall population <i>n</i> = 105	Septic <i>n</i> = 37 (35%)	Non-septic <i>n</i> = 68 (65%)	<i>P</i> value
Age, years	38.1 ± 16.9	34.8 ± 15.6	39.9 ± 17.5	0.15 ^a
Male, % (n)	72.4% (n = 76)	78.4% (n = 29)	69.1% (n = 47)	0.43 ^b
ISS	37.1 ± 9.9	38.7 ± 8.9	36.2 ± 10.4	0.20 ^a
Severe brain injury, % (n)	41% (n = 43)	59% (n = 22)	31% (n = 21)	0.008 ^b
Severe thoracic injury, % (n)	72% (n = 76)	65% (n = 24)	76% (n = 52)	0.30 ^b
SAPS II	36.9 ± 15.6	43 ± 15.4	33.5 ± 14.8	0.003 ^a
Delay for MAP >65 mm Hg, minutes	0 (0 to 0.25)	0 (0 to 16.25)	0 (0 to 0)	0.14 ^c
Need for vasoactive support in emergency room, % (n)	24% (n = 25)	35% (n = 13)	18% (n = 12)	0.077 ^b
Prophylactic antibiotics administered in emergency room, % (n)	42% (n = 44)	35% (n = 13)	46% (n = 31)	0.41 ^b
SOFA score:				
D1	4 (2 to 7)	6 (4 to 9.2)	3 (2 to 5)	0.0001 ^c
D2	4 (2 to 6)	6 (3.75 to 9.25)	2.5 (1 to 5)	<0.0001 ^c
D3	3 (1 to 5)	7 (3 to 9.25)	2 (1 to 3)	<0.0001 ^c
D4	2 (1 to 5)	5 (2 to 8)	2 (1 to 3)	<0.0001 ^c
D5	2 (1 to 4)	4 (1.75 to 7.25)	1 (1 to 2)	<0.0001 ^c
D6	1 (1 to 3)	3 (1 to 7)	1 (1 to 2)	<0.0001 ^c
mHLA-DR levels, antibodies per cell				
D1 and 2	11,371 ± 4,870	11,753 ± 4,291	11,177 ± 5,169	0.62 ^a
D3 and 4	12,224 ± 7,501	9,271 ± 6,029	13,723 ± 7,766	0.004 ^a
D5 and 6	15,623 ± 9,123	11,707 ± 6,004	16,602 ± 9,535	0.05 ^a
Variations in mHLA-DR, antibodies per cell				
D3 and 4/D1 and 2	1.25 ± 0.57	0.83 ± 0.43	1.44 ± 0.53	<0.0001 ^a
D5 and 6/D3 and 4	1.37 ± 1.11	1.32 ± 0.82	1.38 ± 1.18	0.83 ^a
Deaths at day 28, % (n)	6% (n = 6)	8% (n = 3)	4% (n = 3)	0.73 ^b
Mechanical ventilation, % (n)	66% (n = 69)	89% (n = 33)	53% (n = 36)	0.0004 ^b
Duration of mechanical ventilation, days	6 (3 to 11)	9 (6.75 to 19)	3 (2 to 5.5)	<0.0001 ^c
Massive transfusion required, % (n)	29% (n = 31)	35% (n = 13)	26% (n = 18)	0.48 ^b
Volume of transfusion, mL	900 (0 to 2,850)	1,200 (0 to 3,500)	0 (0 to 2,700)	0.067 ^c
Shock (need for vasoactive drug on D1 and 2), % (n)	33% (n = 35)	57% (n = 21)	21% (n = 14)	0.0004 ^b
Length of stay in ICU, days	9 (6 to 15)	15 (10 to 24.25)	7 (5 to 11)	<0.0001 ^c

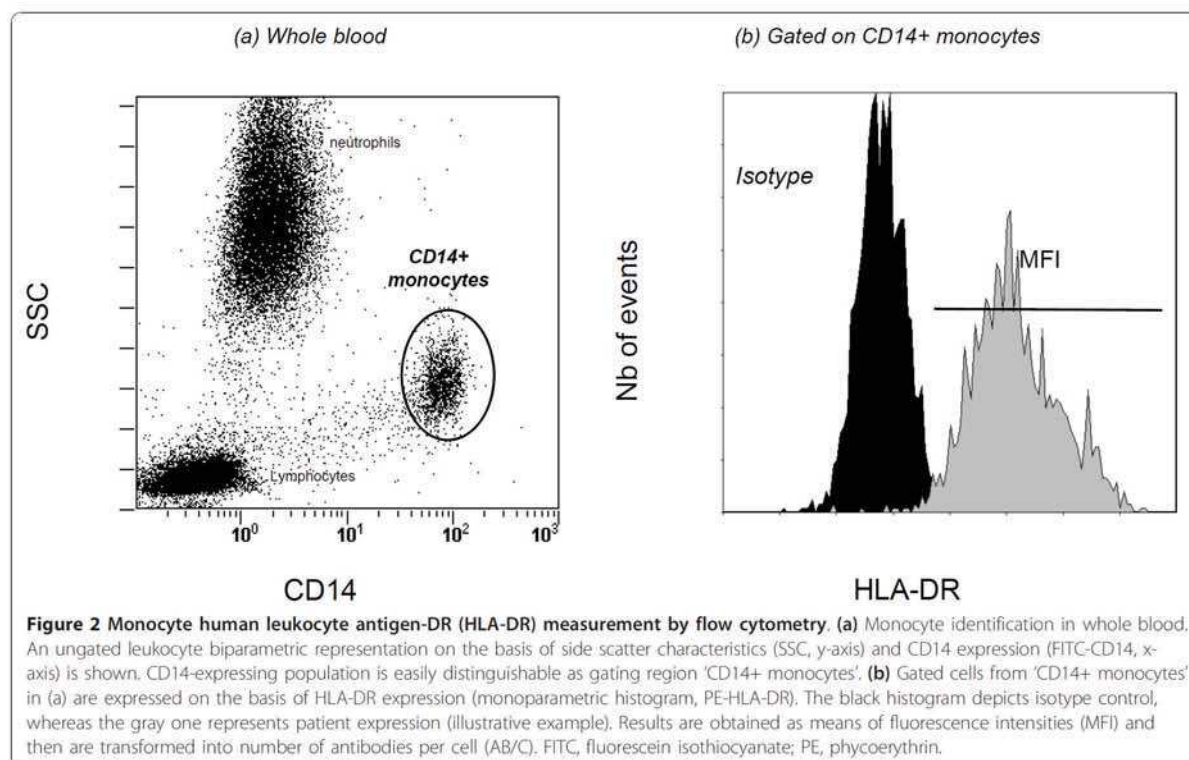
Parametric variables are expressed as mean ± standard deviation, and non-parametric variables are expressed as median (interquartile range) or frequencies.
^aIndependent samples *t* test; ^bchi-square test; ^cMann-Whitney test. D, days; ICU, intensive care unit; ISS, Injury Severity Score; MAP, mean arterial pressure; mHLA-DR, monocyte human leukocyte antigen-DR; SAPS II, Simple Acute Physiology Score II; SOFA, Sepsis-related Organ Failure Assessment.

been rapidly transferred to another hospital for different reasons: no available rooms in our unit or the need for specific care such as aortic rupture isthmus or brain surgery (following severe brain injury). Table 1 shows the baseline characteristics on these 105 patients. SAPS II was significantly higher in septic patients ($P < 0.05$) than in non-septic patients as were the SOFA scores every day during follow-up and the incidence of severe brain injury. There were no statistical differences of the ISS or the incidence of severe thoracic injury between the two groups. In the emergency room, administration of vasoactive drug to maintain an MAP of up to 65 mm Hg and administration of prophylactic antibiotics were not different. Frequency of massive transfusion and the overall quantity of transfused blood were not different for the sepsis and non-sepsis groups over the first 2 post-trauma days. There was a higher proportion of

patients under vasoactive drug during the first 2 days in the septic group ($P = 0.0004$). During follow-up, no difference in renal function (assessed by plasma creatinine concentration) or in lactate concentration was observed. Septic patients required mechanical ventilation more often and for longer periods of time than non-septic patients did ($P < 0.0001$). Six patients died (three from septic shock and three from cardiogenic shock), and there were no statistical differences between the two groups.

Incidence of sepsis

Thirty-seven patients developed sepsis during follow-up. Pneumonia was the more frequent infection ($n = 30$), followed by urinary tract infection ($n = 7$). Causative bacteria were fairly evenly distributed between Gram-positive ($n = 14$) and Gram-negative ($n = 21$) organisms.



Two patients had a mixed bacterial infection (Gram-positive and -negative). The median interval between trauma and onset of sepsis was 4 days (3 to 6.25).

Monitoring of mHLA-DR expression

At day 2, mHLA-DR expression was diminished in all 105 patients (Figure 2 and 3a). At days 1 and 2, mHLA-DR expression showed no statistically significant difference between septic and non-septic patients (Table 1 and Figure 3b). At days 3 and 4, mHLA-DR expression had risen in non-septic patients but remained low in septic patients ($13,723 \pm 7,766$ AB/C versus $9,271 \pm 6,029$ AB/C; $P = 0.004$) (Figure 3b). At days 5 and 6, septic patients still tended to exhibit lower mHLA-DR expression than non-septic patients, but the difference failed to reach statistical significance.

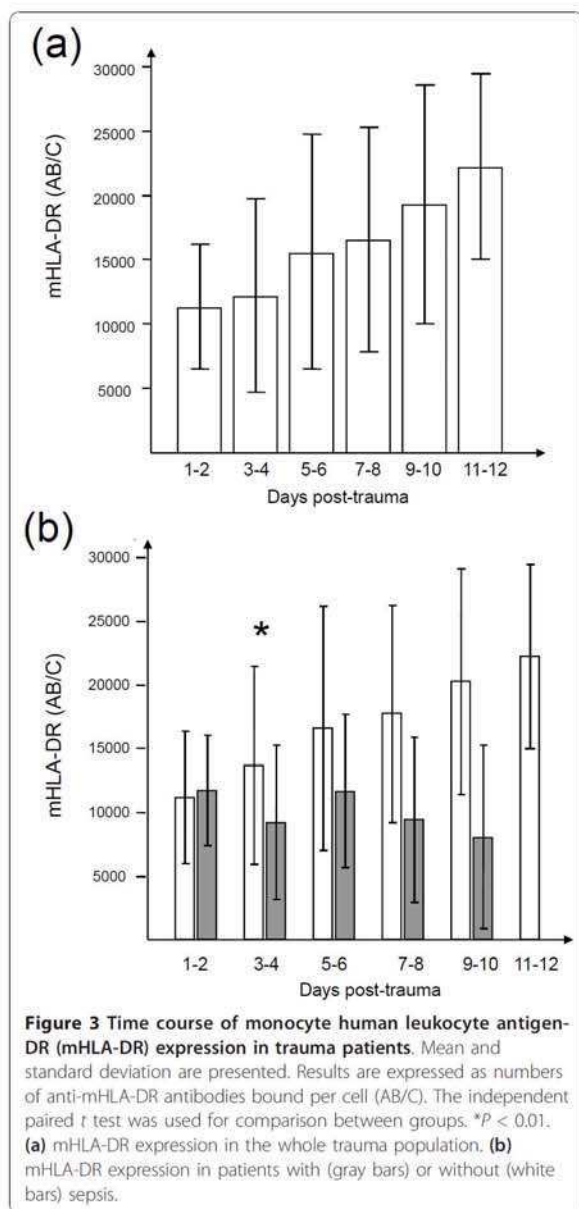
Given the wide fluctuation of mHLA-DR expression data, ratios were calculated between values for two points in time, namely days 3 and 4/days 1 and 2 and days 5 and 6/days 3 and 4. The slope of mHLA-DR expression at days 3 and 4 showed a highly significant statistical difference between non-septic and septic patients (1.44 ± 0.53 versus 0.83 ± 0.43 , respectively; $P < 0.0001$) (Table 1). We next established an ROC analysis (Figure 4). The area under the curve was 0.80 ($P = 0.05$, 95% CI 0.69 to 0.88). ROC curve analysis for delta

mHLA-DR provided a 1.2 variation in mHLA-DR expression (days 3 and 4/days 1 and 2) as the best cutoff value to discriminate between septic and non-septic patients. At that threshold, the test had an 83% sensitivity, a 61% specificity, a 42% positive predictive value, and an 87% negative predictive value. At days 5 and 6, no significant difference was observed in mHLA-DR expression or in the mHLA-DR slope (days 5 and 6/days 3 and 4) between the two patient groups.

Multivariate logistic regression analysis indicated, after adjustment for other confounding factors, that an mHLA-DR ratio of days 3 and 4/days 1 and 2 less than or equal to 1.2 was associated with sepsis to a highly significant degree (adjusted OR 5.41, 95% CI 1.42 to 20.52) (Table 2).

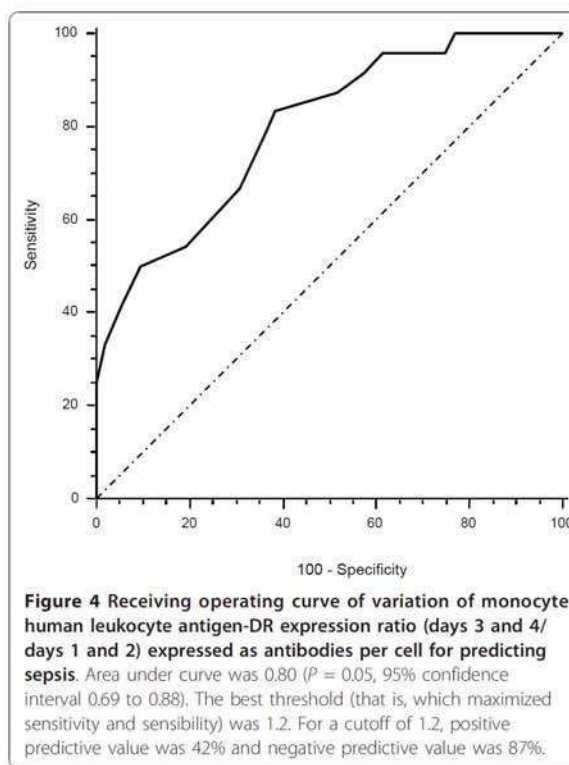
Discussion

Severe injury is characterized by a systemic inflammatory response syndrome involving activation of several cellular systems and the overwhelming production, by the innate immune system, of proinflammatory cytokines and other inflammatory mediators. It is subsequently followed by a compensatory anti-inflammatory response syndrome [35,36]. This negative feedback mechanism has a protective effect over the first few hours after trauma but may become harmful if it



persists. Considerable clinical and experimental evidence indicates that in such patients a number of immune functions are rapidly altered. Monocyte alterations, for example, can decrease phagocytosis, inflammatory cytokine expression, and antigen presentation because of the loss of mHLA-DR expression. Lymphocyte anergy and apoptosis can ensue [3,37-39]. These changes together may increase susceptibility to infection, which in turn could provoke multiple organ failure and death.

Diminished mHLA-DR expression has been proposed as a reliable biomarker of immunosuppression in ICU



patients. Today, it is the most reliable marker and is used in most of the studies about ICU-acquired immunosuppression. More specifically, it has been shown to be a predictor of septic complications in several conditions, including surgical interventions, sepsis, burns, stroke, and pancreatitis [11,40-48]. Immunosuppression has long been postulated as a concomitant of trauma [37,49,50]. In regard to mHLA-DR, the pioneering work of Polk and colleagues [50] reported in 1986 revealed an association between the development of sepsis and low mHLA-DR expression. Subsequently, mHLA-DR expression was assessed as a predictor of sepsis in several series of severely injured patients [15,17,18,20,39,51-53]. A major limitation of these studies is that they were conducted over a 20-year period, during which time case management and methodologies for measurement of mHLA-DR expression have evolved, thereby complicating interpretation and comparison of the findings of these studies.

In the present cohort, incidence of sepsis was 35% and the mortality rate for the entire study was 6%. Though apparently high, these values are in concordance with those of a previous epidemiologic study by Osborn and colleagues [2], in which incidence rates of sepsis were 42% for moderate injury (defined as an ISS of between 15 and 29) and 39% for severe injury (ISS of up to 30).

Table 2 Univariate and multivariate logistic regression analysis used to differentiate septic and non-septic patients

		Univariate (n = 105)			Multivariate (n = 77)		
		OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value
Sex male	Positive	1.62	0.63-4.13	0.3129			
Severe brain injury	Positive	3.28	1.42-7.56	0.005	2.87	0.95-8.72	0.06
Severe thoracic injury	Positive	0.57	0.23-1.37	0.21			
ISS	≥40	2.19	0.95-5.06	0.066	2.84	0.88-9.16	0.08
SAPS II	≥37	3.17	1.38-7.32	0.007	2.01	0.67-6.08	0.21
D3 and 4/D1 and 2 mHLA-DR	≤1.2	4.81	1.45-16	0.009	5.41	1.42-20.52	0.013
Massive transfusion	Positive	1.5	0.63-3.57	0.35			

CI, confidence interval; D, days; ISS, Injury Severity Score; mHLA-DR, monocyte human leukocyte antigen-DR; OR, odds ratio; SAPS II, Simple Acute Physiology Score II.

Another epidemiologic study in trauma patients reported a low sepsis incidence, but most of the patients presented with mild injury (ISS of less than 15: 67.7%) and no brain injury [54], the latter of which is known to be a risk factor for developing pneumonia [55-58]. In our cohort, septic patients presented more trauma brain injury than the non-septic patients did, and this is in concordance with the literature.

The present study showed an overall reduction in mHLA-DR expression in trauma patients. Most importantly, in injured patients with an uneventful outcome, mHLA-DR expression returned to normal within a week. In contrast, in patients who developed infection, mHLA-DR levels remained low or fell even lower.

It would appear that the steepness of the slope of mHLA-DR recovery is a more significant indicator than the levels attained at a given point in time. Indeed, the incidence of sepsis was significantly greater in the group with a slope of less than 1.2 (days 3 and 4/days 1 and 2). This suggests that patients in whom recovery in mHLA-DR expression did not begin between days 1 and 2 and days 3 and 4 had an increased risk of developing sepsis. This observation is consistent with recent findings reported by Lukaszewicz and colleagues [59] in surgical patients. Significantly, in the present study, multivariate logistic regression analysis indicated that low mHLA-DR expression was independently associated with the development of sepsis, whereas all the other parameters included in the analysis (ISS, SAPS II, presence of a severe brain trauma, and massive transfusion) were not predictive. A slope of mHLA-DR of less than 1.2 was independently associated with the risk of developing sepsis, a finding that reflects the possible pivotal role of immune dysfunction in the increased risk of infection in trauma patients. In Table 1 some variables that may seem relevant (like the length of stay in the ICU and the duration of mechanical ventilation) were not included in the multivariate analysis, because they have to be considered as a consequence of the development of sepsis and not a risk factor. Moreover, it has to

be considered that the onset of sepsis is early (median at day 4) and that every patient was still in the ICU at this time point.

Chest trauma is reported to account for one third of acute-trauma emergency room admissions, and 30% to 75% of trauma patients have pulmonary contusions [60], usually as a result of rapid deceleration [61]. The incidence of lung injury seemed to be quite significant in our study (72%) and is probably due to the severity of the trauma patients included. However, there were no differences between the presences of thoracic injury between infected and non-infected groups. The pathophysiology of pulmonary contusion includes a strong inflammatory response in the lung parenchyma, resulting in increased alveolocapillary permeability, pulmonary edema, ventilation/perfusion mismatch, increased pulmonary shunting, and loss of compliance. As at the systemic level, this local response is followed by an anti-inflammatory response. Muehlstedt and colleagues [19] observed not only altered HLA-DR expression on the surface of alveolar macrophages in the lungs of trauma patients who developed sepsis but also altered production of other cytokines. Local organ immunosuppression was present and may have been responsible for the development of nosocomial pneumonia in the injured patients [19].

As far as the authors can ascertain, this is the first study, using the standardized test described by the European multicenter study [33] and multivariate analysis, aimed specifically at evaluating mHLA-DR expression in a cohort of severe trauma patients. Most previous studies have been conducted in smaller series of patients spanning a highly variable spectrum of severity (from mild to severe trauma) [15-17,58]. Furthermore, these studies did not include multivariate analysis for assessment of the usual clinical confounders of mHLA-DR expression levels, nor did they exclude mHLA-DR expression data following onset of sepsis, as the present study did (see Materials and methods) in order to avoid bias from possible amplification by the sepsis itself of

lowered mHLA-DR expression. Finally, the data from previous studies are not readily comparable, owing to differences, from one study to another, in the values studied (mainly 'percentages of positive monocytes' or 'mean fluorescence intensity'), which are generally specific for a given laboratory and therefore defy comparability on a wider scale. The European protocol now recommends expression of the results as numbers of antibodies per cell, a recommendation that will facilitate comparison of data obtained by different laboratories.

The present study has a number of limitations. First, it is a single-center study. The findings clearly need to be confirmed by a multicenter study. Second, the study enrolled only 105 patients. Though relatively small, the series was very homogeneous in terms of severity and also highly representative of the trauma patient population commonly encountered. Finally, mHLA-DR expression was measured every 2 days after trauma. However, the mean onset of infection was on day 4; in some patients, this limited the amount of analyzable mHLA-DR expression data available before day 4. In subsequent studies, follow-up of patients should consist of daily monitoring during the early post-trauma period. Indeed, one potentially interesting objective of a future study would be an assessment of the usefulness of daily mHLA-DR measurements to detect patients at an increased risk of infection. To pre-empt development of infection, clinicians could give these patients prophylactic treatment, such as antibiotics [48], immunostimulant by interferon-gamma [62], or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, as used in septic shock [35].

Conclusions

Trauma induces a temporary, relative immunosuppression characterized by diminished mHLA-DR expression. The pattern of progression of mHLA-DR expression over time appears to be a more useful indicator of increased risk of infection than the actual levels of mHLA-DR expression at given points in time. Patients in whom recovery of mHLA-DR expression begins after days 1 and 2 are likely to have an uneventful outcome, whereas those with persistently lower levels of mHLA-DR expression are more likely to suffer infection. Large, multicenter studies are needed to confirm these promising results.

Key messages

- Severe trauma patients present with a transient immunosuppression with decreased mHLA-DR expression.
- The lack of mHLA-DR recovery between days 3 and 4 and days 1 and 2 is associated with sepsis.
- After adjustment for classic confounding risk factors, the lack of mHLA-DR recovery was the sole

factor independently and significantly associated with the development of sepsis.

Abbreviations

AB/C: antibodies per cell; BPW: biphasic pulse transmittance waveform; CI: confidence interval; ICU: intensive care unit; ISS: Injury Severity Score; MAP: mean arterial pressure; MHLA-DR: monocyte human leukocyte antigen-DR; OR: odds ratio; ROC: receiver operating characteristic; SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II; SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment.

Acknowledgements

This work was supported by the Hospices Civils de Lyon. We thank the technical staff of the immunology laboratory of Edouard Herriot University Hospital.

Author details

¹Hospices Civils de Lyon, Service de réanimation, Hôpital Edouard Herriot, 8 place d'Arsonval - 69437 Lyon Cedex 03, France. ²Hospices Civils de Lyon, Laboratoire d'immunologie cellulaire, Hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval - 69437 Lyon Cedex 03, France. ³Hospices Civils de Lyon, Service de chirurgie d'urgence, Hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval - 69437 Lyon Cedex 03, France.

Authors' contributions

AC helped to design the study, collected the clinical information, analyzed the raw data, performed statistical analysis, drafted the paper, and contributed to the writing of the paper. BF helped to design the study and to include patients, participated with AC in the interpretation of all data, and contributed to the writing of the paper. BA and GMo helped to design the study, participated with AC in the interpretation of all data, and contributed to the writing of the paper. CaG, FP, and CM helped to perform the experiments. JC, AF, ChG, GMa, AV, and OM helped to include patients. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 21 July 2010 Revised: 27 September 2010

Accepted: 19 November 2010 Published: 19 November 2010

References

1. Kauvar DS, Wade CE: The epidemiology and modern management of traumatic hemorrhage: US and international perspectives. *Crit Care* 2005, **9**(Suppl 5):S1-9.
2. Osborn TM, Tracy JK, Dunne JR, Pasquale M, Napolitano LM: Epidemiology of sepsis in patients with traumatic injury. *Crit Care Med* 2004, **32**:2234-2240.
3. Tschoeke SK, Ertel W: Immunoparalysis after multiple trauma. *Injury* 2007, **38**:1346-1357.
4. Keel M, Trentz O: Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005, **36**:691-709.
5. Adib-Conquy M, Cavaillon JM: Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 2009, **101**:36-47.
6. Bone RC: Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996, **125**:680-687.
7. Ward NS, Casserly B, Ayala A: The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med* 2008, **29**:617-625, viii.
8. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD: Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 2000, **26** Suppl 1:124-128.
9. Munford RS, Pugin J: Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**:316-321.
10. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003, **348**:138-150.
11. Zhang DP, Yan FL, Xu HQ, Zhu YX, Yin Y, Lu HQ: A decrease of human leucocyte antigen-DR expression on monocytes in peripheral blood

- predicts stroke-associated infection in critically-ill patients with acute stroke. *Eur J Neurol* 2009, **16**:498-505.
12. Volk HD, Reinke P, Docke WD: Immunological monitoring of the inflammatory process: Which variables? When to assess? *Eur J Surg Suppl* 1999, **584**: 70-72.
 13. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Muller JM, Docke WD, Kox WJ: Monocyte deactivation—rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 1996, **22** Suppl 4:474-481.
 14. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A: Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 2008, **14**:64-78.
 15. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC: Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg* 1990, **77**:204-207.
 16. Sherry RM, Cue JI, Goddard JK, Parramore JB, DiPiro JT: Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients. *J Trauma* 1996, **40**:613-616, discussion 616-617.
 17. Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Rebmann V, Ferencik S, Majetschak M, Schmid EN, Oberlack U, Hirche H, Schade UF, Grosse-Wilde H: HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Ann Surg* 1999, **229**:246-254.
 18. Giannoudis PV, Smith RM, Windsor AC, Bellamy MC, Guillou PJ: Monocyte human leukocyte antigen-DR expression correlates with intrapulmonary shunting after major trauma. *Am J Surg* 1999, **177**:454-459.
 19. Muehlstedt SG, Lyte M, 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**:443-450.
 20. Walsh DS, Thavichaigarn P, Pattanapanyasat K, Siritongtaworn P, Kongcharoen P, Tongtawe P, Yongvanitchit K, Jiarakul N, Dheeradhada C, Pearce FJ, Wiesmann WP, Webster HK: Characterization of circulating monocytes expressing HLA-DR or CD71 and related soluble factors for 2 weeks after severe, non-thermal injury. *J Surg Res* 2005, **129**:221-230.
 21. Baker SP, O'Neill B, Haddon W Jr, Long WB: The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma* 1974, **14**:187-196.
 22. Greenspan L, McLellan BA, Greig H: Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: a scoring chart. *J Trauma* 1985, **25**:60-64.
 23. Wilson RF, Dulchavsky SA, Soullier G, Beckman B: Problems with 20 or more blood transfusions in 24 hours. *Am Surg* 1987, **53**:410-417.
 24. Hewitt PE, Machin SJ: ABC of transfusion. Massive blood transfusion. *BMJ* 1990, **300**:107-109.
 25. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F: A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993, **270**:2957-2963.
 26. Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S: Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* 1998, **26**:1793-1800.
 27. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992, **20**:864-874.
 28. American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America: Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **171**:388-416.
 29. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM: CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988, **16**:128-140.
 30. Chopin N, Floccard B, Sobas F, Illinger J, Boselli E, Benatir F, Levrat A, Guillaume C, Crozon J, Negrier C, Allaouchiche B: Activated partial thromboplastin time waveform analysis: a new tool to detect infection? *Crit Care Med* 2006, **34**:1654-1660.
 31. Delannoy B, Guye ML, Hay Slaiman D, Lehot JJ, Cannesson M: Effect of cardiopulmonary bypass on activated partial thromboplastin time waveform analysis, serum procalcitonin and C-reactive protein concentrations. *Crit Care* 2009, **13**:R180.
 32. Dempfle CE, Lorenz S, Smolinski M, Wurst M, West S, Houdijk WP, Quintel M, Borggrefe M: Utility of activated partial thromboplastin time waveform analysis for identification of sepsis and overt disseminated intravascular coagulation in patients admitted to a surgical intensive care unit. *Crit Care Med* 2004, **32**:520-524.
 33. Döcke WD, Hofflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk HD, Kunz D: Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 2005, **51**:2341-2347.
 34. Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard AL, Gutowski MC, Bienvenu J, Lepape A: Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem* 2002, **48**:1589-1592.
 35. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **180**:640-648.
 36. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA: The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001, **193**:237-244.
 37. Faist E, Mewes A, Strasser T, Walz A, Alkan S, Baker C, Ertel W, Heberer G: Alteration of monocyte function following major injury. *Arch Surg* 1988, **123**:287-292.
 38. Faist E, Schinkel C, Zimmer S: Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg* 1996, **20**:454-459.
 39. Kampalath B, Cleveland RP, Chang CC, Kass L: Monocytes with altered phenotypes in posttrauma patients. *Arch Pathol Lab Med* 2003, **127**:1580-1585.
 40. Venet F, Tissot S, Debard AL, Faudot C, Crampe C, Pachot A, Ayala A, Monneret G: Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med* 2007, **35**:1910-1917.
 41. Satoh A, Miura T, Satoh K, Masamune A, Yamagiwa T, Sakai Y, Shibuya K, Takeda K, Kaku M, Shimosegawa T: Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes as a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis. *Pancreas* 2002, **25**:245-250.
 42. Gotzinger P, Sautner T, Spittler A, Barlan M, Wamsler P, Roth E, Jakesz R, Fugger R: Severe acute pancreatitis causes alterations in HLA-DR and CD14 expression on peripheral blood monocytes independently of surgical treatment. *Eur J Surg* 2000, **166**:628-632.
 43. Tschalkowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schuttler J: Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med* 2002, **30**:1015-1023.
 44. Allen ML, Peters MJ, Goldman A, Elliott M, James I, Callard R, Klein NJ: Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and prolonged stay in pediatric cardiac intensive care. *Crit Care Med* 2002, **30**:1140-1145.
 45. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ: Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 1993, **80**:205-209.
 46. Efron PA, Matsumoto T, McAuliffe PF, Scumpia P, Ungaro R, Fujita S, Moldawer LL, Foley D, Hemming AW: Major hepatectomy induces phenotypic changes in circulating dendritic cells and monocytes. *J Clin Immunol* 2009, **29**:568-581.
 47. Yang HM, Yu Y, Chai JK, Hu S, Sheng ZY, Yao YM: Low HLA-DR expression on CD14+ monocytes of burn victims with sepsis, and the effect of carbachol in vitro. *Burns* 2008, **34**:1158-1162.
 48. Harms H, Prass K, Meisel C, Klehmet J, Rogge W, Drenckhahn C, Gohler J, Bereswill S, Gobel U, Wernecke KD, Wolf T, Arnold G, Halle E, Volk HD, Dimagl U, Meisel A: Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *PLoS ONE* 2008, **3**:e2158.
 49. O'Mahony JB, Palder SB, Wood JJ, McIrvine A, Rodrick ML, Demling RH, Mannick JA: Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J Trauma* 1984, **24**:869-875.
 50. Polk HC Jr, George CD, Wellhausen SR, Cost K, Davidson PR, Regan MP, Borzotta AP: A systematic study of host defense processes in badly injured patients. *Ann Surg* 1986, **204**:282-299.

51. Giannoudis PV, Smith RM, Perry SL, Windsor AJ, Dickson RA, Bellamy MC: Immediate IL-10 expression following major orthopaedic trauma: relationship to anti-inflammatory response and subsequent development of sepsis. *Intensive Care Med* 2000, **26**:1076-1081.
52. Huschak G, Zur Nieden K, Stuttmann R, Riemann D: Changes in monocytic expression of aminopeptidase N/CD13 after major trauma. *Clin Exp Immunol* 2003, **134**:491-496.
53. Hershman MJ, Cheadle WG, Kufnec D, Polk HC Jr, George CD: An outcome predictive score for sepsis and death following injury. *Injury* 1988, **19**:263-266.
54. Muckart DJ, Bhagwanjee S: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 1997, **25**:1789-1795.
55. Sarrafzadeh AS, Peltonen EE, Kaisers U, Kuchler I, Lanksch WR, Unterberg AW: Secondary insults in severe head injury—do multiply injured patients do worse? *Crit Care Med* 2001, **29**:1116-1123.
56. Polderman KH, Tjong Tjin Joe R, Peerdeman SM, Vandertop WP, Girbes AR: Effects of therapeutic hypothermia on intracranial pressure and outcome in patients with severe head injury. *Intensive Care Med* 2002, **28**:1563-1573.
57. Bronchard R, Albaladejo P, Brezac G, Geffroy A, Seince PF, Morris W, Branger C, Marty J: Early onset pneumonia: risk factors and consequences in head trauma patients. *Anesthesiology* 2004, **100**:234-239.
58. Schirmer-Mikalsen K, Vik A, Givold SE, Skandsen T, Hynne H, Klepstad P: Severe head injury: control of physiological variables, organ failure and complications in the intensive care unit. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007, **51**:1194-1201.
59. Lukaszewicz AC, Griénay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D: Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 2009, **37**:2746-2752.
60. Allen GS, Coates NE: Pulmonary contusion: a collective review. *Am Surg* 1996, **62**:895-900.
61. Raghavendran K, Notter RH, Davidson BA, Helinski JD, Kunkel SL, Knight PR: Lung contusion: inflammatory mechanisms and interaction with other injuries. *Shock* 2009, **32**:122-130.
62. Turina M, Dickinson A, Gardner S, Polk HC Jr: Monocyte HLA-DR and interferon-gamma treatment in severely injured patients—a critical reappraisal more than a decade later. *J Am Coll Surg* 2006, **203**:73-81.

doi:10.1186/cc9331

Cite this article as: Cheron *et al.*: Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma. *Critical Care* 2010 **14**:R208.

6. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock

Fabienne Venet, Fanny Davin, Caroline Guignant, Audrey Larue, Marie-Angélique Cazalis, Romain Darbon, Caroline Allombert, Bruno Mougin, Christophe Malcus, Françoise Poitevin-Later, Alain Lepape, Guillaume Monneret.

Shock, 2010; 34(4): 358-63

Au cours de la phase d'immunodépression qui fait suite à la réponse initiale pro-inflammatoire du choc septique, différentes altérations touchent l'immunité innée et adaptative. En particulier, la valeur absolue des lymphocytes circulants est fortement réduite au cours de cette phase d'immunodépression. De nombreuses questions persistent quant à la précocité de la lymphopénie après le début du choc septique, son évolution au cours des 48 premières heures de prise en charge des patients et le type de sous-population lymphocytaire touchée. L'objectif de notre étude était de répondre à ces différentes questions en monitorant 21 patients en choc septique depuis le début du choc (considéré comme le moment où le patient recevait des catécholamines vasopressives) et toutes les 6 heures pendant les premières 48 heures.

Nous avons observé (par cytométrie en flux) que la lymphopénie était présente dès le début du choc septique et qu'elle touchait l'ensemble des sous-populations lymphocytaires, à savoir les lymphocytes T ($CD4^+$ et $CD8^+$), les lymphocytes B et les cellules *Natural Killer*. La mesure de l'expression des ARN des facteurs de transcription de plusieurs sous-populations de lymphocytes $CD4^+$ (T-bet, GATA-3, FOXP3 et ROR-gamma, évaluée par PCR quantitative en temps réel) a montré que les cellules Th1, Th2, T régulateur et Th17 respectives étaient diminuées. La lymphopénie de toutes les populations lymphocytaires précédentes était stable pendant les premières 48 heures après le choc.

Un élément clé dans la prise en charge du choc septique est le traitement initial rapide de l'infection par l'administration d'antibiotiques et le contrôle de la source. Pour que l'éradication de l'infection soit optimale, il faudrait que les capacités de défense des cellules immunitaires soient préservées. Or, la présente étude indique que dès les premières heures du choc, les différentes populations lymphocytaires sont en nombre fortement réduit. Cette notion est à prendre en compte dans la perspective de toute thérapeutique à visée anti-inflammatoire.

EARLY ASSESSMENT OF LEUKOCYTE ALTERATIONS AT DIAGNOSIS OF SEPTIC SHOCK

Fabienne Venet,* Fanny Davin,[†] Caroline Guignant,[‡] Audrey Larue,[†] Marie-Angélique Cazalis,[†] Romain Darbon,[†] Caroline Allombert,[†] Bruno Mougin,[†] Christophe Malcus,[‡] Françoise Poitevin-Later,[‡] Alain Lepape,^{*§} and Guillaume Monneret^{*‡}

*Hospices Civils de Lyon, CRB "Sepsis"; [†]Laboratoire Commun de Recherche bioMérieux and [‡]Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon; and [§]Intensive Care Units, Hospices Civils de Lyon, Lyon-sud University Hospital, Pierre-Bénite, France

Received 19 Jan 2010; first review completed 2 Feb 2010; accepted in final form 26 Feb 2010

ABSTRACT—A dramatic decrease in circulating lymphocyte number is regularly described after septic shock. However, it is unknown how early this alteration develops after diagnosis of shock and if it remains stable over time. Twenty-one septic shock patients with no comorbidities were included within 2 h after the beginning of vasopressive treatment. Flow cytometry phenotyping of circulating leukocyte subpopulations and quantitative real-time polymerase chain reaction of T-bet, GATA-3, FOXP3, and ROR γ mRNA were performed in patients from the diagnosis of shock and every 6 h during the subsequent 48 h. From their admission in the intensive care unit, patients present with major alterations of circulating leukocyte count (leukocytosis, neutrophilia, and major lymphopenia). The numbers of every lymphocyte subpopulations (T, B, and natural killer cells) were diminished. Gene expression analysis of transcription factors specific for T_H1, T_H2, CD4⁺CD25⁺ regulatory, and T_H17 lymphocytes showed a severe decrease in comparison with healthy individuals' values. These alterations remain stable during the first 48 h after inclusion in the protocol despite early and aggressive resuscitation and antibiotherapy administered in patients. At the time of diagnosis of shock and admission in the intensive care unit, septic patients already present with severe lymphopenia involving every lymphocyte subsets including CD4⁺ T-cell subpopulations. No significant variation could be detected within the first 48 h. This should be taken into account in the forthcoming clinical trials testing immunomodulating therapies in septic shock patients.

KEYWORDS—Septic shock, lymphocyte, FOXP3, T-bet, GATA-3, ROR γ

INTRODUCTION

Despite marked improvement in critical care medicine and almost 20 years of anti-inflammatory clinical trials, septic syndromes (association of a systemic inflammatory reaction to an infection) are the leading cause of death in noncoronary intensive care units (ICUs) and a major health care problem worldwide (1–3). During the last 20 years, septic syndrome mortality has remained constant (from 30% to 50% for septic shock), and incidence has been continuously rising because of the constant aging of the population and the better care of comorbidities (diabetes, cancer, etc.). Severe sepsis, for example, is projected to represent one million cases per year before the year 2020 in the United States alone (1, 4).

Sepsis initiates a complex immunologic response that varies over time, with the concomitant occurrence of both proinflammatory and anti-inflammatory mechanisms alternatively predominating (2, 5). After a short proinflammatory phase, septic patients enter a stage of protracted immunosuppression illustrated by reactivation of dormant viruses (cytomegalovirus or herpes simplex virus) or infections due to germs normally pathogenic solely in immunocompromised host

(2, 5–7). Importantly, the intensity and duration of this phase of immunosuppression seem to be closely correlated with mortality and the development of nosocomial infections (2, 8, 9).

So far, studies have principally investigated dysfunctions of the innate side of the immune response after severe sepsis. However, dramatic alterations of the lymphocytic part of the immune response are also regularly described in patients (2, 5). These dysfunctions have been known for long and are mainly characterized by a decrease in total lymphocyte number (10, 11) and by a state of anergy illustrated both by a decreased proliferation after stimulation *ex vivo* (12) and by decreased response to standard skin tests (10, 13–16). The major importance of this lymphopenia in sepsis pathophysiology is illustrated by animal studies showing that prevention of lymphocyte apoptosis improves the likelihood of survival after sepsis (17–20).

Whereas lymphopenia has been shown to persist during the first week after admission of septic patients to the ICU (21), it is unknown when (i.e., how early after diagnosis of shock/admission in the ICU) these alterations develop, if they vary over time during the so-called golden hours after diagnosis of shock, and if the different lymphocyte subpopulations are equally diminished. This study was therefore designed to perform a systematic monitoring of the different circulating leukocyte subpopulations measured in septic shock patients from the time of diagnosis of shock and every 6 h during the first 48 h.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The study group consisted in 21 patients diagnosed with septic shock according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physician/Society

Address reprint requests to Guillaume Monneret, PhamD, PhD, Laboratoire d'Immunologie, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, Pavillon E-5 place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France. E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr.

This work was supported by the Hospices Civils de Lyon and was conducted through logistical support (H. Thizy, M. Provent, and F. Gueyffier) from the Centre d'Investigation Clinique (Clinical Research Center) of INSERM and Hospices Civils de Lyon.

DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181dc0977

Copyright © 2010 by the Shock Society

of Critical Care Medicine (22). To minimize heterogeneity, patients were included only if they present with no comorbidity. Septic shock was defined, according to classic definition, by an identifiable site of infection, hypotension persisting despite fluid resuscitation and requiring vasopressor therapy, and evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: (a) temperature greater than 38°C or less than 36°C, (b) heart rate greater than 90 beats/min, (c) respiratory rate greater than 20 breaths/min, and (d) white blood cell count of more than 12,000/ μ L or less than 4,000/ μ L. Severity was assessed by the Simplified Acute Physiology Scale II (23). Mortality was defined as death occurring within 28 days after the onset of shock. Cell phenotyping was performed within 2 h after the onset of vasopressor therapy, arbitrary chosen as the inclusion time, and every 6 h during the following 48 h. This prospective study was reviewed by the institutional ethics committee. Informed consent was obtained for each patient or relatives before the first blood drawing.

Flow cytometry

Apart from white blood cell and differential leukocyte count (obtained from the routine hematology laboratory), the following lymphocyte subsets were analyzed: total T lymphocytes (CD45⁺CD3⁺), CD4⁺ T lymphocytes (CD45⁺CD4⁺CD3⁺), CD8⁺ T lymphocytes (CD45⁺CD8⁺CD3⁺), total B cells (CD45⁺CD19⁺), and natural killer cells (NK cells, CD45⁺CD3⁻CD56⁺). The flow cytometry gating strategy is shown in Figure 1.

Flow cytometric (FC500; Beckman-Coulter, Hialeah, Fla) expression of cell-surface markers was assessed on peripheral whole blood collected on EDTA anticoagulant tubes. Monoclonal antibodies were used according to the manufacturer's recommendations: fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD45, PC5-labeled anti-CD3, PE-labeled anti-CD4, ECD-labeled anti-CD8, ECD-labeled anti-CD19, and PE-labeled anti-CD56 (Beckman-Coulter). The red cells were lysed on the automated TQ Prep system (Beckman-Coulter). Absolute count was performed using Flow-Count Fluorospheres according to manufacturer's recommendations (Beckman-Coulter). Results are expressed as numbers of cells per microliter of blood. Age-matched reference values were provided by the routine flow cytometry laboratory of our institution.

Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of FOXP3, T-bet, GATA-3, and ROR γ

Peripheral blood mRNA expression was measured using samples collected directly in PAXGene Blood RNA tubes (PreAnalytix, Hombrechtikon, Switzerland). Total RNA was extracted using the PAXGene Blood RNA kit

(PreAnalytix). The residual genomic DNA was digested using the RNase-free DNase set (Qiagen, Germantown, Md). The integrity and quality of the total RNA were assessed on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, Calif) by means of the RNA 6000 Nano assay (Agilent). Total RNAs were reverse transcribed into cDNA using SuperScript real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) system (Invitrogen, Carlsbad, Calif) according to manufacturer's instructions. mRNA expression was quantified using quantitative RT-PCR (qRT-PCR) as previously described (24). Briefly, PCR reactions were performed in a LightCycler 2.0 instrument using the Fast-Start DNA Master SYBR Green I RT-PCR kit according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Ind). Thermocycling was performed in a final volume of 20 μ L containing 3 mM MgCl₂ and 0.5 μ M each of the required primers. Polymerase chain reaction was performed with an initial denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of a touch-down PCR protocol (10 s at 95°C, 10-s annealing at 68°C to 58°C, and 16-s extension at 72°C). mRNA expression of the housekeeping gene peptidylpropyl isomerase B (PPIB), encoding for cyclophilin B, and the four transcription factors (FOXP3, T-bet, GATA-3, and ROR γ) were investigated using specific cDNA standards and ready-to-use primer mixes obtained from Search-LC (Heidelberg, Germany). The efficiency of PPIB mRNA levels has been already demonstrated as reference for target mRNA quantification in human peripheral blood (25). Serial dilutions of the cDNA standard were prepared in quadruplicate to generate standard curves. Relative standard curves, describing the PCR efficiency of each target genes and PPIB, were created and used to perform efficiency-corrected quantification with the LightCycler software version 4.05. An internal calibrator (pooled mRNA extracted from 10 healthy volunteers' whole blood sampled using PAXGene tubes) was used to compare each reverse transcription. The results were expressed as normalized ratio of FOXP3, T-bet, GATA-3, or ROR γ mRNA/PPIB mRNA and compared with results from a cohort of age-matched healthy volunteers.

Statistics

Comparisons between groups were made using the nonparametric Mann-Whitney *U* test (analysis of transcription factor mRNA expressions), whereas comparisons versus normal/test values (medians) were performed using the signed rank sum test with *P* < 0.05 considered as statistically significant with correction by the number of tests performed. The nonparametric Wilcoxon paired test was used to assess variations between hour 0 (H0) and hour 48 (H48) for each lymphocyte subpopulation. Finally, variability over time for each marker was evaluated using linear mixed-effects models. In these

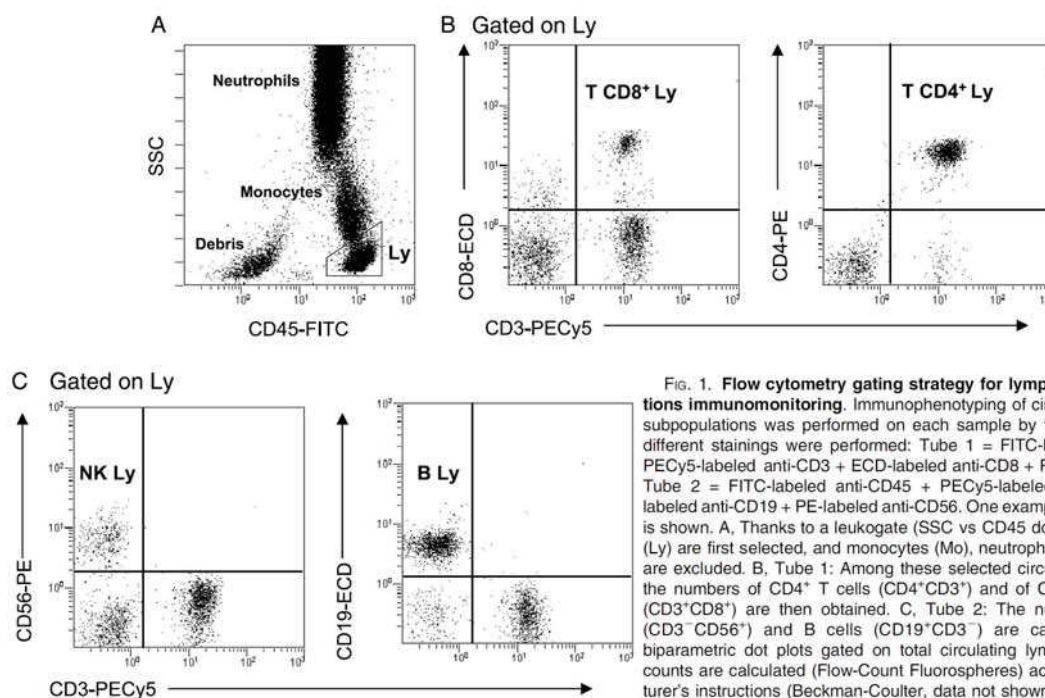


FIG. 1. Flow cytometry gating strategy for lymphocyte subpopulations immunomonitoring. Immunophenotyping of circulating lymphocyte subpopulations was performed on each sample by flow cytometry. Two different stainings were performed: Tube 1 = FITC-labeled anti-CD45 + PECy5-labeled anti-CD3 + ECD-labeled anti-CD8 + PE-labeled anti-CD4. Tube 2 = FITC-labeled anti-CD45 + PECy5-labeled anti-CD3 + ECD-labeled anti-CD19 + PE-labeled anti-CD56. One example in a septic patient is shown. A, Thanks to a leukogate (SSC vs CD45 dot plot), lymphocytes (Ly) are first selected, and monocytes (Mo), neutrophils (Neu), and debris are excluded. B, Tube 1: Among these selected circulating lymphocytes, the numbers of CD4⁺ T cells (CD4⁺CD3⁺) and of CD8⁺ T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺) are then obtained. C, Tube 2: The numbers of NK cells (CD3⁻CD56⁺) and B cells (CD19⁺CD3⁻) are calculated based on biparametric dot plots gated on total circulating lymphocytes. Absolute counts are calculated (Flow-Count Fluorospheres) according to manufacturer's instructions (Beckman-Coulter, data not shown).

models, the null hypothesis was that, for each marker, the slope calculated over 48 h was equal to zero. The analyses were performed using Sigma Stat software (version 3.5; Systat Software, Chicago, Ill).

RESULTS

Twenty-one septic shock patients with no comorbidities, as shown by a low Charlson score, were prospectively included in the study. Clinical data are presented in Table 1. Four patients died (28-day mortality: 19%), among whom 2 died during the first 48 h. There was no delay between diagnosis of shock and admission in the ICU (Table 1).

Serial blood samples were obtained from patients at the time of diagnosis of shock (i.e., within 2 h after the beginning of vasoactive treatment) and every 6 h during the first 48 h afterward. Flow cytometry phenotyping of circulating cells was performed, and results were compared with normal, age-matched values from our routine immunology laboratory.

We first observed that septic shock patients present with a marked and significant leukocytosis that was present from the inclusion time and remained constant during the whole monitoring (linear mixed-effects model, Table 2). This increase in white blood cell count was due to an increase in the number of circulating neutrophils, whereas the number of circulating monocytes was overall not modified in patients in comparison with normal values (Table 2). In marked contrast, total lymphocyte absolute number was markedly and significantly diminished from the inclusion time (Table 2) and remained extremely low during the whole monitoring (i.e., during the first 48 h after inclusion, linear mixed-effects model).

Regarding circulating lymphocyte subpopulations, a marked decrease in T, B, and NK cells was observed (Table 2; Fig. 2). This diminution was present from the time of admission in the ICU and stable during the first 48 h (linear mixed-effects model; Table 2; Fig. 2A). No significant variation could be observed between values measured at H0 and H48 (Fig. 2A).

Within T lymphocytes, CD4⁺ and CD8⁺ T-cell numbers were equally decreased during the whole monitoring (Table 2; Fig. 2, A and B). No significant variations (neither increase nor decrease, linear mixed-effects model) were observed during the first 48 h (Fig. 2, A and B), although for T cells and CD4⁺ T lymphocytes, the nadir was measured at inclusion in the protocol. As an example, box plots as well as individual values for CD4⁺ T cells are presented in Figure 2B.

Finally, to evaluate the potential variations of CD4⁺ T-cell subpopulations, transcription factors specific for T_H2 (GATA-3), T_H1 (T-bet), regulatory T cell (Treg; FOXP3), and newly described T_H17 (ROR γ) cells were measured by qRT-PCR in patients and compared with a cohort of age-matched healthy individuals (n = 11, 4 women and 7 men; mean age, 51 [SD, 6] years). Not surprisingly, a significantly reduced expression of each transcription factors was observed. This decrease was measured at inclusion and at each time point during the whole monitoring (Fig. 3). Interestingly, when normalized based on the number of circulating CD4⁺ T lymphocytes for each patient at each time point, every transcription factors returned within the range of normal values (data not shown).

Of note, significantly lower numbers of circulating neutrophils and CD4⁺ T lymphocytes were measured at H0 in

TABLE 1. Demographic, clinical, and biological data for septic shock patients

Parameters	Patients (n = 21), n (%)
Age at admission,* y	58 (58–79)
Sex	
Male	12 (57)
Simplified Acute Physiology Scale II at diagnosis of shock*	45 (34–57)
McCabe score	
0	15 (71)
1	5 (25)
2	1 (5)
Charlson score*	2 (1–3)
Delay shock-ICU,* d	0 (0–1)
Main diagnosis category	
Medical	12 (57)
Surgery	9 (45)
Infection	
Diagnosis	
Only radiologically diagnosed	2 (10)
Only surgically diagnosed	2 (10)
Microbiologically documented	17 (81)
Bacilli gram-negative	13 (62)
Cocci gram-positive	7 (33)
Fungi	2 (10)
Others	0 (0)
Type of infection	
Community acquired	13 (65)
Hospital acquired	7 (33)
ICU acquired	1 (5)
Site of infection	
Pulmonary	4 (20)
Abdominal	10 (48)
Urinary	3 (14)
Catheter	2 (9)
Others	2 (9)
Mortality	
Survivors	17 (81)

For categorical data, results are presented as number of cases and percentages respective to the total patient's population between brackets. For continuous data, results are presented as medians and interquartile ranges (Q1–Q3).

*Continuous data.

patients with pulmonary infections in comparison with patients with abdominal infections. No significant differences were observed between patients with gram-negative bacilli (n = 9) and gram-positive cocci (n = 3) infections (we did not consider mixed-germ infections), or between survivors (n = 17) and nonsurvivors (n = 4, data not shown).

DISCUSSION

As a result of their ability to interact with cells of the innate immune system (i.e., macrophages, dendritic cells, neutrophils, NK cells) and with other cells of the adaptive immune

TABLE 2. Circulating white blood cell (WBC) phenotyping in septic shock patients

	H0	H6	H12	H18	H24	H30	H36	H42	H48	Normal values
WBC, × 10 ³	12 (7-16)	16* (11-20)	15* (9-21)	13* (10-20)	13* (10-17)	13* (10-17)	13* (9-15)	12* (10-16)	13* (8-15)	4-10
Neutrophils, × 10 ³	10* (5-13)	15* (10-18)	15* (8-19)	11* (9-16)	11* (8-15)	10* (8-15)	11* (8-13)	11* (9-15)	11* (6-13)	1.7-7
Monocytes, × 10 ³	0.5 (0.4-0.7)	0.8 (0.5-1)	0.7 (0.6-1.1)	0.7 (0.4-0.9)	0.8 (0.6-1)	0.7* (0.5-0.9)	0.7 (0.5-0.9)	0.7* (0.5-0.8)	0.7 (0.5-0.8)	0.1-1
Lymphocytes, × 10 ³	0.5† (0.3-0.8)	0.6† (0.5-1.1)	0.5† (0.4-0.9)	0.7† (0.5-0.9)	0.7† (0.5-1)	0.7† (0.5-1)	0.6† (0.5-0.9)	0.7† (0.4-1)	0.5† (0.3-0.9)	1.3-3.2
B cells	87* (51-132)	112* (69-201)	104* (79-171)	105* (86-174)	115* (83-211)	111* (83-162)	102* (82-161)	95* (81-182)	86* (69-156)	150-450
NK cells	49† (29-67)	66† (26-91)	51† (25-74)	37† (28-66)	42† (22-64)	47† (21-68)	36† (19-63)	32† (19-48)	29† (13-42)	50-600
T cells	313* (172-640)	419* (293-883)	349† (290-704)	580† (289-700)	585† (381-722)	517† (396-696)	516† (307-666)	524† (289-724)	463† (225-728)	900-1,900
CD4 ⁺ T	168* (101-376)	219* (182-544)	202† (155-362)	262† (170-457)	326† (222-514)	330† (162-480)	321† (168-428)	353† (144-448)	230† (139-464)	500-1,250
CD8 ⁺ T	146* (57-268)	176* (87-359)	128† (80-216)	193† (83-323)	209† (111-286)	173† (116-277)	156† (82-274)	162† (81-262)	149† (82-303)	350-900

Blood samples were obtained from 21 septic shock patients within 2 h after the beginning of vasopressor treatment and every 6 h during 48 h afterward. The following leukocyte subsets were analyzed: total WBC count, number of neutrophils, monocytes, lymphocytes, T lymphocytes (T cells) CD4⁺ T lymphocytes (CD4⁺ T), CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺ T), total B cells (B cells), and NK cells. Results are expressed as number of cells/μL [median (95% confidence intervals for the median)]. Normal values from our laboratory for age-matched individuals are shown. Comparisons versus normal/test values (medians) were performed using the signed rank sum test with correction for the number of tests performed. *P < 0.0056. †P < 0.0001.

system, lymphocytes play a central role in the anti-infectious immune response not only as effectors but also as regulators of this response. This has been illustrated by the observation of a dysregulated, proinflammatory immune response after polymicrobial septic challenge in mice lacking T and B cells (19, 26).

Alterations of the lymphocytic response after septic shock have been known for long. They comprise (a) phenotypic alterations including an increase in inhibitory coreceptor expression associated with a decreased expression of activating coreceptors and CD3, (b) functional alterations mainly characterized by a decreased *ex vivo* lymphocyte proliferation associated with decreased T_H1 and increased T_H2 immune responses, (c) induction of regulatory T-cell populations, and (d) an increased apoptosis leading to a marked lymphopenia (2, 5).

This marked decrease in circulating lymphocyte number has been regularly reported in patients after sepsis and severe trauma (12, 25, 27-31). Most importantly, the extent of this lymphopenia has been associated with the development of nosocomial infections in ICU patients. For example, Hotchkiss et al. (28) observed a marked lymphoid depletion in adults dying of sepsis. These patients had reduced CD4⁺ T- and B-cell numbers and the degree of reduction in cell numbers related

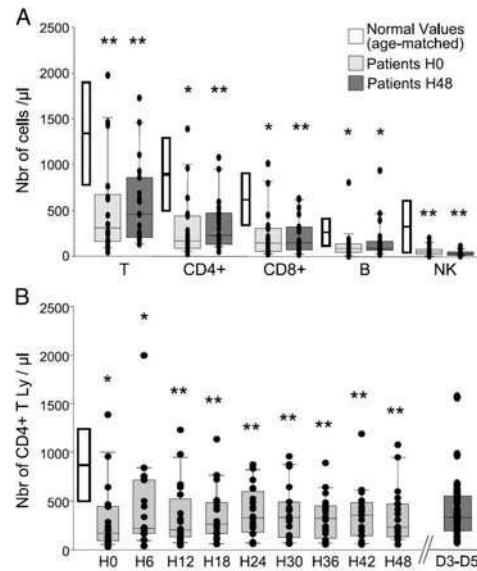


FIG. 2. Septic shock patients present with severe lymphopenia from the time of admission and during the first 48 h. Blood samples were obtained from 21 septic shock patients within 2 h after the beginning of vasopressor treatment and every 6 h during 48 h afterward. The following lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry: total T lymphocytes (CD45⁺CD3⁺), CD4⁺ T lymphocytes (CD45⁺CD4⁺CD3⁺), CD8⁺ T lymphocytes (CD45⁺CD8⁺CD3⁺), total B cells (CD45⁺CD19⁺), and NK cells (CD45⁺CD3⁻CD56⁺). A, Box plots as well as individual values are presented for measurements at H0 (light gray boxes) and H48 (dark gray boxes) for each lymphocyte subpopulations. Box plots (median ± 2 SDs, open boxes) for age-matched normal values from our laboratory are shown for each lymphocyte subpopulations. B, Total phenotyping for circulating CD4⁺ T lymphocytes is presented (light gray boxes) in comparison with normal values from our laboratory. In addition, values for circulating CD4⁺ T cells previously published by our group (34) at days 3 to 5 in a similar cohort of septic shock patients are shown (dark gray box). Comparisons versus normal/test values (medians) were performed using the signed rank sum test with correction for the number of tests performed. *P < 0.0056, **P < 0.0001 versus normal values.

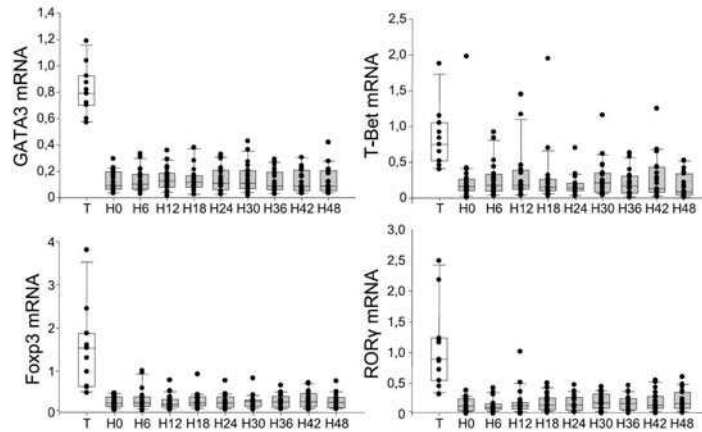


FIG. 3. Gene expressions for CD4⁺ T-cell-specific transcription factors are dramatically decreased after septic shock. Blood samples were obtained from 21 septic shock patients within 2 h after the beginning of vasopressive treatment and every 6 h during 48 h afterwards. mRNA expressions for transcription factors specific for T_H2 (GATA-3), T_H1 (T-bet), CD4⁺CD25⁺ Treg cells (FOXP3), and T_H17 (RORγ) cells were measured by qRT-PCR. As a control group, gene expressions were measured in a cohort of healthy individuals (*n* = 11, 4 women and 7 men; mean age, 51 [SD, 6] years). Results for each transcription factor measured at each time point in septic shock patients (gray boxes) and healthy individuals (open boxes) are presented as box plots and individual values. Results are expressed as normalized ratio of FOXP3, T-bet, GATA-3, or RORγ mRNA versus PPIB mRNA. The decrease was statistically significant (*P* < 0.0056) at all time points for every transcription factor. Comparisons between groups were made using the nonparametric Mann Whitney *U* test with correction for the number of tests performed.

to the duration of sepsis before death. Similarly, Felmet et al. (29) observed that an absolute lymphocyte count of less than 1,000 cell/μL not only identified critically ill children at high risk for nosocomial infection, but also that an absolute lymphocyte count of less than 1,000/μL persisting for 7 days identified those at risk for death from uneradicating nosocomial infection.

However, in the literature, circulating lymphocyte numbers have been mainly monitored in patients starting from day 1 after the onset of shock and usually only once within the first days. What happens before day 1 (i.e., between the time of diagnosis of shock and the end of the first day after shock) is unknown. Based on the biphasic model usually described for the immune response after severe sepsis (2, 5, 19) and on the fact that the adaptive/lymphocytic immune response is thought to be involved in a second time/after an infection, one may postulate that lymphocyte number may be within the normal range at diagnosis of shock but decreases later on. In this context, this study is the first to perform a systematic monitoring of every circulating leukocyte subset in septic shock patients, starting from the time of admission in the ICU and every 6 h during the first 48 h. This systematic monitoring has allowed us to obtain a precise view of the development of these alterations and of their variability over time during the first 48 h.

Importantly, we observed that leukocyte alterations described in the literature after septic shock are already present at the time of inclusion in the study: leukocytosis associated with marked neutrophilia and profound lymphopenia. Monocyte number, in contrary, was not modified, although it is well known that many of their functions are altered (2, 5). Among lymphocytes, the numbers of every subpopulation were decreased as well. Interestingly, when measuring CD4⁺ T-cell-specific transcription factors (T-bet for T_H1, GATA-3 for T_H2, FOXP3 for Treg, and RORγ for T_H17), they all appeared equally diminished. Because qRT-PCR was performed on mRNA

extracted from whole blood, these decreased expressions could be related with the marked diminution in CD4⁺ T-cell number. Despite the apparent normalization of these mRNA levels when corrected by CD4⁺ T-cell absolute count, we cannot definitively rule out a specific downregulation of one of these transcription factors in some CD4⁺ cell subsets. This thus deserves to be confirmed in isolated cells.

These results are in line with previous studies by our group measuring either T-bet and GATA-3 or FOXP3 mRNA at days 1 and 2 after the onset of shock (25, 32). Regarding RORγ, very few studies have been published so far investigating the role of T_H17 cells in sepsis pathophysiology. In a murine model of sepsis, Flierl et al. (33) observed that IL-17a circulating levels were increased after sepsis and that specific blockade of this cytokine was associated with decreased mortality. However, the present results tend to show that RORγ behaves after septic shock as other T-cell-specific transcription factors.

The second important point of this study is that these alterations remain stable during the first 48 h after diagnosis of shock despite early and aggressive resuscitation therapy and antibiotherapy administered in patients. When put into perspective with our previously published data, it seems that they persist even longer, as illustrated in Figure 2B. Indeed, values for total T cells and for CD4⁺ T cells measured at H48 in this study are very similar to values measured at days 3 to 5 in previous studies by our group (25, 30, 34). This suggests that early and aggressive therapy in patients has no effect on lymphopenia and that it may be interesting to install a more specific treatment to restore normal lymphocyte numbers because lymphopenia has been shown to be related with increased mortality after sepsis.

Overall, our data suggest that the causes of this prolonged lymphopenia and lymphoid depletion, likely multifactorial, most probably occur before admission of patients to the ICU. This highlights the major difference between murine models

of sepsis, in which this onset of shock can be precisely timed, and clinical situations, in which when patients are admitted to the ICU several hours may have elapsed after the onset of shock. This is most likely the major limitation of our study: although patients were included immediately after the diagnosis of shock (illustrated by the requirement for catecholamines), the "real" start of the infection could never be determined precisely. It is probable that the infectious process has started well before and most likely is culminating with the septic shock clinical picture. Another limitation would be that our limited cohort has a low mortality probably in relation with the absence of comorbidities and also because of a very early management of septic shock in our ICUs. With that said, despite this putative lower severity, lymphopenia measured in these patients is still extremely marked.

Finally, our data, although apparently incremental to the already described lymphopenia after septic shock, show for the first time that these major lymphocytic alterations described are present at the time of diagnosis, remain stable during the first 48 h afterward, and concern every lymphocyte subset. We thus believe this study provides several important and complementary information to previous literature in the field and increases our understanding of the lymphocytic alterations of the immune response occurring in septic shock patients. The sepsis-induced loss of lymphocytes may be particularly important because of the extensive and very early depletion of critical immune effector cells. This should be taken into account in the forthcoming clinical trials testing immunomodulating therapies in septic shock patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr A. Pachot for his great help in the realization of this project.

REFERENCES

- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29:1303-1310, 2001.
- Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348:138-150, 2003.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: Septic shock. *Lancet* 365:63-78, 2005.
- Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 35:1244-1250, 2007.
- Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A: Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 14: 64-78, 2008.
- Luyt CE, Combes A, Deback C, Aubriot-Lorton MH, Nieszkowska A, Trouillet JL, Capron F, Agut H, Gibert C, Chastre J: Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 175:935-942, 2007.
- Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, Gibran NS, Huang ML, Santo Hayes TK, Corey L, et al.: Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 300:413-422, 2008.
- Munford RS, Pugin J: Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 163:316-321, 2001.
- Pugin J: Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp* 280:21-27; discussion 27-36, 160-164, 2007.
- Nishijima MK, Takezawa J, Hosotsubo KK, Takahashi H, Shimada Y, Yoshiya J: Serial changes in cellular immunity of septic patients with multiple organ-system failure. *Crit Care Med* 14:87-91, 1986.
- McCredie JA, Austin TW, Holliday RL, Sibbald WJ: Predictive value for survival of lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes in patients with sepsis. *Can J Surg* 22:447-451, 1979.
- Roth G, Moser B, Krenn C, Brunner M, Haisjackl M, Almer G, Gerlitz S, Wolner E, Boltz-Nitulescu G, et al.: Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and T_H2 predominance. *Biochem Biophys Res Commun* 308:840-846, 2003.
- Levy EM, Alharbi SA, Grindlinger G, Black PH: Changes in mitogen responsiveness lymphocyte subsets after traumatic injury: relation to development of sepsis. *Clin Immunol Immunopathol* 32:224-233, 1984.
- Antonacci AC, Reaves LE, Calvano SE, Amand R, De Riesthal HF, Shires GT: Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations after thermal injury in human beings. *Surg Gynecol Obstet* 159:1-8, 1984.
- Cheadle WG, Mercer-Jones M, Heinzelmann M, Polk HC Jr: Sepsis and septic complications in the surgical patient: who is at risk? *Shock* 6(suppl 1):S6-S9, 1996.
- Dahn MS, Whitcomb MP, Lange MP, Jacobs LA: Altered T-lymphocyte subsets in severe sepsis. *Am Surg* 54:450-455, 1988.
- Oberholzer C, Oberholzer A, Bahjat FR, Minter RM, Tannahill CL, Abouhamze A, LaFace D, Hutchins B, Clare-Salzler MJ, Moldawer LL: Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11503-11508, 2001.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE: Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14541-14546, 1999.
- Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, et al.: Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 1:496-501, 2000.
- Manjuck J, Saha DC, Astiz M, Eales LJ, Rackow EC: Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med* 135:153-160, 2000.
- Monserat J, de Pablo R, Reyes E, Diaz D, Barcenilla H, Zapata MR, De la Hera A, Prieto A, Alvarez-Mon M: Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit Care* 13:R26, 2009.
- Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL: The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 101:1481-1483, 1992.
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F: A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270:2957-2963, 1993.
- Pachot A, Monneret G, Brion A, Venet F, Bohe J, Bienvenu J, Mouglin B, Lepape A: Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med* 33:31-38; discussion 236-237, 2005.
- Venet F, Pachot A, Debarb AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G: Increased percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4⁺CD25⁻ lymphocytes. *Crit Care Med* 32:2329-2331, 2004.
- Shelley O, Murphy T, Paterson H, Mannick JA, Lederer JA: Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock* 20:123-129, 2003.
- Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Cooperson CM, Karl IE: Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol* 174:5110-5118, 2005.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, et al.: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166:6952-6963, 2001.
- Felmet KA, Hall MW, Clark RS, Jaffe R, Carcillo JA: Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoproliferative anemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol* 174:3765-3772, 2005.
- Venet F, Bohe J, Debarb AL, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G: Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med* 33:2836-2840, 2005.
- Holub M, Kluckova Z, Beneda B, Hobstova J, Huzicka I, Prazak J, Lobovska A: Changes in lymphocyte subpopulations and CD3⁺/DR⁺ expression in sepsis. *Clin Microbiol Infect* 6:657-660, 2000.
- Pachot A, Monneret G, Voirin N, Leissner P, Venet F, Bohe J, Payen D, Bienvenu J, Mouglin B, Lepape A: Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin Immunol* 114:61-69, 2005.
- Flierl MA, Rittirsch D, Gao H, Hoessel LM, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ferrara JL, et al.: Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *FASEB J* 22:2198-2205, 2008.
- Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G: Increased circulating regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 35:678-686, 2009.

7. Upregulation of the pro-apoptotic genes BID and FAS in septic shock patients

Fanny Turrel-Davin, Caroline Guignant, Alain Lepape, Bruno Mouglin, Guillaume Monneret, Fabienne Venet.

Critical Care 2010, 14:R133

L'apoptose lymphocytaire est un des mécanismes qui participe à l'état d'immunodépression développé par les patients en choc septique. Des thérapeutiques visant à bloquer les mécanismes apoptotiques pourraient être envisagées pour rétablir le nombre et ainsi les fonctions lymphocytaires. Cependant il est important d'être en mesure de cibler les patients qui pourraient présenter un bénéfice à recevoir un tel traitement. Dans ce but, des biomarqueurs utilisables en pratique courante dans les laboratoires hospitaliers doivent donc être développés. L'objectif de l'étude était d'évaluer les performances de marqueurs connus de l'apoptose tels que la fixation d'annexine V, l'expression de la caspase-3 active ou de BCL-2 (par cytométrie en flux) ainsi que l'expression des ARNm de molécules pro- et anti-apoptotiques, dans une cohorte de patients en choc septique, dans les conditions de monitoring d'un laboratoire de routine hospitalière.

Dans notre étude, l'évaluation de la fixation d'annexine V, de l'expression de la caspase-3 active ou de BCL-2 chez les patients en choc septique ne permet pas de mettre en évidence de manière significative l'apoptose lymphocytaire. Au contraire, l'expression ARNm des molécules pro-apoptotiques BID et FAS est fortement augmentée chez ces patients par rapport aux sujets sains. Cette étude montre également la difficulté à mesurer l'apoptose avec les marqueurs habituellement décrits dans la littérature, dans les conditions courantes de fonctionnement d'un laboratoire hospitalier.

RESEARCH

Open Access

Upregulation of the pro-apoptotic genes BID and FAS in septic shock patients

Fanny Turrel-Davin¹, Caroline Guignant², Alain Lepape^{1,3}, Bruno Mougin¹, Guillaume Monneret^{1,2}, Fabienne Venet^{2*}

Abstract

Introduction: Lymphocyte apoptosis has been suggested to play a central role in sepsis pathophysiology, and studies in animal models demonstrated that blocking this pathway improves outcome. However, no routine biomarkers of apoptosis are so far available in patients. Thus, the aim of our study was to assess the different biomarkers of apoptosis putatively usable on a routine basis in septic shock.

Methods: Thirteen septic shock patients (sampled twice between days 1 to 2 and days 3 to 5 after diagnosis of shock) and 15 sex-matched and age-matched healthy controls were prospectively enrolled. Apoptosis was measured in lymphocyte subpopulations using flow cytometry (Annexin-V binding, activated caspase-3 and Bcl-2 expressions). Representative pro-apoptotic and anti-apoptotic gene expressions were assessed by quantitative reverse-transcription PCR. Monocyte HLA-DR expression and lymphocyte subpopulation cell counts were measured as markers of sepsis-induced immune dysfunctions. To test for statistical significance, the Mann-Whitney U test was used with correction by the number of tests performed.

Results: Flow cytometric measurements of apoptosis in septic shock patients showed an increased Annexin-V binding on CD4⁺ T cells and an increased active caspase-3 expression on B cells only at days 3 to 5 (sixfold change and twofold change, respectively). Gene expression analysis showed an increased BCL-XL mRNA and an upregulation of the pro-apoptotic genes BID and FAS in septic shock patients (10-fold change and fivefold change, respectively) compared with healthy controls.

Conclusions: The present study highlights the difficulties encountered in monitoring apoptosis on a routine basis in septic patients, whereas in the same sampling conditions and on the same patients, HLA-DR expression and lymphocyte subpopulation cell counts showed characteristics described in the literature. However, pro-apoptotic genes BID and FAS appear to constitute promising apoptosis markers in our hands.

Introduction

Despite advances in supportive care, sepsis remains one of the most challenging clinical problems worldwide - constituting the leading cause of death in noncoronary intensive care units (ICUs) [1].

Sepsis initiates a complex immunologic response that varies over time with the concomitant occurrence of both pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms alternatively predominating [1,2]. After a short pro-inflammatory phase, septic patients enter a stage of protracted immunosuppression illustrated by reactivation of

dormant viruses (cytomegalovirus or herpes simplex virus) or infections due to germs normally pathogenic solely in an immunocompromised host [3]. Importantly, the intensity and duration of this phase of immunosuppression appear to be closely correlated with mortality and the development of nosocomial infections [1,4].

Although the mechanistic and molecular bases for sepsis-induced immunosuppression have not yet been fully established, alterations of both innate and adaptive immune responses have been described [1,4]. In particular, an increased leukocyte apoptosis has been observed in septic patients [5]. Two major apoptotic pathways are activated: the extrinsic or death receptor-initiated caspase-8 mediated pathway, involving the superfamily of TNF receptor members; and the intrinsic or mitochondria-initiated caspase-9

* Correspondence: fabienne.venet@chu-lyon.fr

²Hospices Civils de Lyon - Immunology Department, Hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval, 69437 Lyon cedex 03, France

pathway, which interplays between pro-apoptotic and anti-apoptotic members of the BCL-2 family [6].

Interestingly, numerous studies in animal models of sepsis showed that blocking programmed cell death improves outcome after septic challenge [6]. This approach could thus represent a potential innovative therapeutic strategy in septic shock. Since no clinical signs of apoptosis have been described, however, there is thus an urgent need to develop robust biomarkers available on a routine basis for the monitoring of this phenomenon. In patients, Weber and colleagues recently observed an extensive apoptosis of circulating lymphocytes after severe sepsis (upregulation of BIM and BID gene expression, and a downregulation of the anti-apoptotic molecules BCL-2 and BCL-XL) [7].

Parallel to this work, the aim of the current study was to test the capacity of such well-known markers of apoptosis (Annexin-V binding, active caspase-3 and BCL-2 expressions measured by flow cytometry, and the balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic mRNA expressions measured by quantitative reverse-transcription (qRT) PCR to detect the activation of this cell-death pathway in circulating blood of septic shock patients in the condition of routine laboratory monitoring. Despite increased mRNA expressions of the pro-apoptotic genes BID and FAS, our results highlight the difficulties encountered in the monitoring on a routine basis of apoptosis in septic patients.

Materials and methods

Patients and controls

The present study was conducted in 13 consecutive patients with septic shock prospectively included according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [8]. Patients were admitted to the two participating ICUs (one medical, one surgical) of the Lyon-Sud University Hospital (Hospices Civils de Lyon, France). Septic shock was defined by an identifiable site of infection, by hypotension persisting despite fluid resuscitation and requiring vasopressor therapy, and by evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$, heart rate >90 beats/minute, respiratory rate >20 breaths/minute, and white blood cell count $>12,000/\text{mm}^3$ or $<4,000/\text{mm}^3$. The onset of septic shock was defined by the beginning of vasopressive therapy. The only exclusion criteria were patients younger than 18 years old and the absence of circulating leukocytes. Patients were treated according to the standardized recommendations of our ICUs. Severity at the onset of shock was assessed by the Simplified Acute Physiology Score II (range: 0 to 194) [9].

Laboratory analyses were performed on residual ethylenediamine tetraacetic acid-anticoagulated blood after completing routine follow-up performed in the ICUs, in

accordance with the guidelines for clinical research of our institute (which, in this case, waived the need for informed consent). Arterial blood samples were obtained at days 1 to 2 (D1-2) and days 3 to 5 (D3-5) after the onset of shock (one sample per period). After blood sampling in the ICUs, tubes were transported at 4°C to the immunology laboratory within 2 hours in accordance with our usual routine protocol for monocyte HLA-DR monitoring [10]. Flow cytometry staining was first performed as described below, and the remaining blood was then processed to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by Ficoll density gradient centrifugation (within 3 hours). To provide panels of control values for mRNA quantification and flow cytometry analysis, 15 sex-matched and age-matched healthy individuals (age 60.6 ± 5.37 years; eight females, seven males) with no known co-morbidities were also included.

Cell isolation before mRNA analysis

PBMCs were isolated within 3 hours after blood collection by Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Amersham Biosciences, Björkgatan, Sweden) and washed with PBS, while the remaining red blood cells were lysed. Cellular concentration was determined and cell viability was assessed using the trypan blue exclusion method before the cell pellet was conserved in RNA Cell Protect (Qiagen, Hilden, Germany) at -20°C until RNA extraction.

RNA extraction and cDNA synthesis by reverse transcription

Total RNA was extracted from PBMCs using RNeasy Plus Mini kits (Qiagen). For each RNA extraction, the residual genomic DNA was digested using the gDNA Eliminator spin column (Qiagen) and RNA was diluted in 30 μl elution buffer. RNA quantity was determined for each sample using a Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was then synthesized from 20 ng total RNA using the WT-Ovation™ System (NuGEN, San Carlos, CA, USA) powered by Ribo-SPIA™ technology. Briefly, first-strand cDNA is generated using a unique first-strand DNA/RNA chimeric primer mix and reverse transcriptase. mRNA was subsequently fragmented, allowing the synthesis of a second strand by DNA polymerase. Finally, the Ribo-SPIA™ amplification provides highly efficient amplification of DNA sequences.

Quantitative PCR analysis of apoptotic genes and HLA-DR

Messenger RNA expression was quantified using quantitative PCR. Briefly, PCR reactions were performed in a LightCycler® 480 instrument using the associated SYBR Green I Master Mix according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis,

IN, USA). For amplification, the reaction volume was 20 µl and the cycling conditions were an initial denaturation step of 95°C for 5 minutes (one cycle), followed by 45 cycles of a touch-down PCR protocol (20 seconds at 95°C, 15 seconds annealing at 68 to 58°C and 15 seconds extension at 72°C), a melting curve of 95°C for 1 second, 60°C for 10 seconds and 95°C for 5 minutes, and, to finish, a cooling cycle at 40°C for 30 seconds.

The mRNA expression of the housekeeping gene peptidylpropyl isomerase B (PPIB) encoding for cyclophilin B was investigated using specific cDNA standards and ready-to-use primer mixes obtained from Search-LC (Heidelberg, Germany). The efficiency of PPIB mRNA levels has been previously demonstrated as the reference for target mRNA quantification in human peripheral blood [11]. The apoptotic genes (BCL-2, the anti-apoptotic forms of BCL-XL, BAX, BAK, BIM, BID and FAS) and HLA-DRA PCR amplicons were obtained with the primer combinations presented in Table 1. Serial dilutions of the cDNA were prepared in quadruplicate to generate

standard curves. Relative standard curves, describing the PCR efficiency of apoptotic genes and PPIB, were created and used to perform efficiency-corrected quantification with the LightCycler® software version 1.5. An internal calibrator was used to compare each cDNA amplification. The results are expressed as the normalized ratio of BCL-2, BCL-XL, BAX, BAK, BIM, BID FAS and HLA-DRA mRNA relative to PPIB mRNA. The qRT-PCR results were only included in the analysis if PPIB mRNA values were comprised within the standard curve - which accounts for most of the missing values.

Apoptosis measurements by flow cytometry

One hundred microliters of whole blood were incubated with PE-Cy7-labeled anti-CD3 or anti-CD19 antibodies and PE-Cy5-labeled anti-CD4 or anti-CD8 antibodies (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), and were then lysed using VersaLyse lysing solution (Beckman-Coulter, Hialeah, FL, USA).

Apoptosis induction in each specific lymphocyte sub-population - CD4⁺ T cells (CD4⁺CD3⁺), CD8⁺ T cells (CD8⁺CD3⁺) and B cells (CD19⁺) - was assessed using Annexin-V binding, intracellular active caspase-3 and Bcl-2 expression measurements.

Regarding Annexin-V binding experiments, according to the manufacturer's protocol, lysed samples were incubated for 15 minutes with PE-labeled Annexin-V (Annexin-V-PE apoptosis detection kit; BD Pharmingen) and measured on a flow cytometer within 30 minutes (FC500; Beckman-Coulter). Results are expressed as percentages of respective cell populations positive for Annexin-V binding. A threshold for positivity was set up based on nonstained controls.

For active caspase-3 and Bcl-2 intracellular stainings, following two washes, lysed cells were permeabilized using Cytofix/Cytoperm reagent (BD Pharmingen) and were incubated with either PE-labeled anti-active caspase 3 antibodies or PE-labeled anti-Bcl-2 antibodies (BD Pharmingen). Isotype control antibodies were used to determine nonspecific binding. After one further wash, cells were analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the mean fluorescence intensity.

Circulating lymphocyte phenotyping and monocyte

HLA-DR measurements by flow cytometry

Monocyte HLA-DR expression was assessed as described previously [10]. Representative examples of mHLA-DR staining by flow cytometry in one patient and one volunteer are presented in Figure 1a. The following lymphocyte subsets were analyzed: total T lymphocytes (CD45⁺CD3⁺), CD4⁺ T lymphocytes (CD45⁺CD4⁺CD3⁺), and CD8⁺ T lymphocytes (CD45⁺CD8⁺CD3⁺). Monoclonal antibodies were used according to the manufacturer's recommendations: FITC-labeled anti-CD45, PC5-labeled

Table 1 Quantitative reverse-transcription PCR performance, parameters and primers

Gene symbol	UniGene	Efficiency ^a	Error ^b	Primer sequences ^c
<i>BCL2</i>	Hs.150749	1.87	0.0059	5'-GCGACGACTTCTCCCGC-3' 5'-GCGATGTTGTCCACCAGG-3'
<i>BCL-XL</i>	Hs.516966	1.89	0.0101	5'-GTAGTGAATGAACCTTCCG-3' 5'-GTATCCCAGCCGCCGTTCTC-3'
<i>BAX</i>	Hs.624291	1.75	0.0297	5'-CAAACCTGGTGCTCAAGG-3' 5'-CCAACCACCCTGGTCTGG-3'
<i>BAK</i>	Hs.485139	1.91	0.0175	5'-GCCACCAGCCTGTTGAG-3' 5'-CTGCCACCAGCCACCC-3'
<i>BIM</i>	Hs.469658	1.95	0.0112	5'-GAGCCACAAGACAGGAGC-3' 5'-CCATTGCACTGAGATAGTGG-3'
<i>BID</i>	Hs.591054	1.69	0.0184	5'-TGGTGTGGCTTCTCCAA-3' 5'-GAATCTGCCTCTATTCTCC-3'
<i>FAS</i>	Hs.244139	1.93	0.0198	5'-GGAATCATCAAGGAATGCAC-3' 5'-CCAAACAATTAGTGAATTGG-3'
<i>HLA-DRA</i>	Hs.520048	2.04	0.0195	5'-GCCAACCTGGAAATCATGACA-3' 5'-AGGGCTGTTCTGTGAGCACA-3'

^aAmplification efficiency of standard curve. ^bThe standard curve error value. ^cTop sequence is forward primer, bottom is reverse primer.

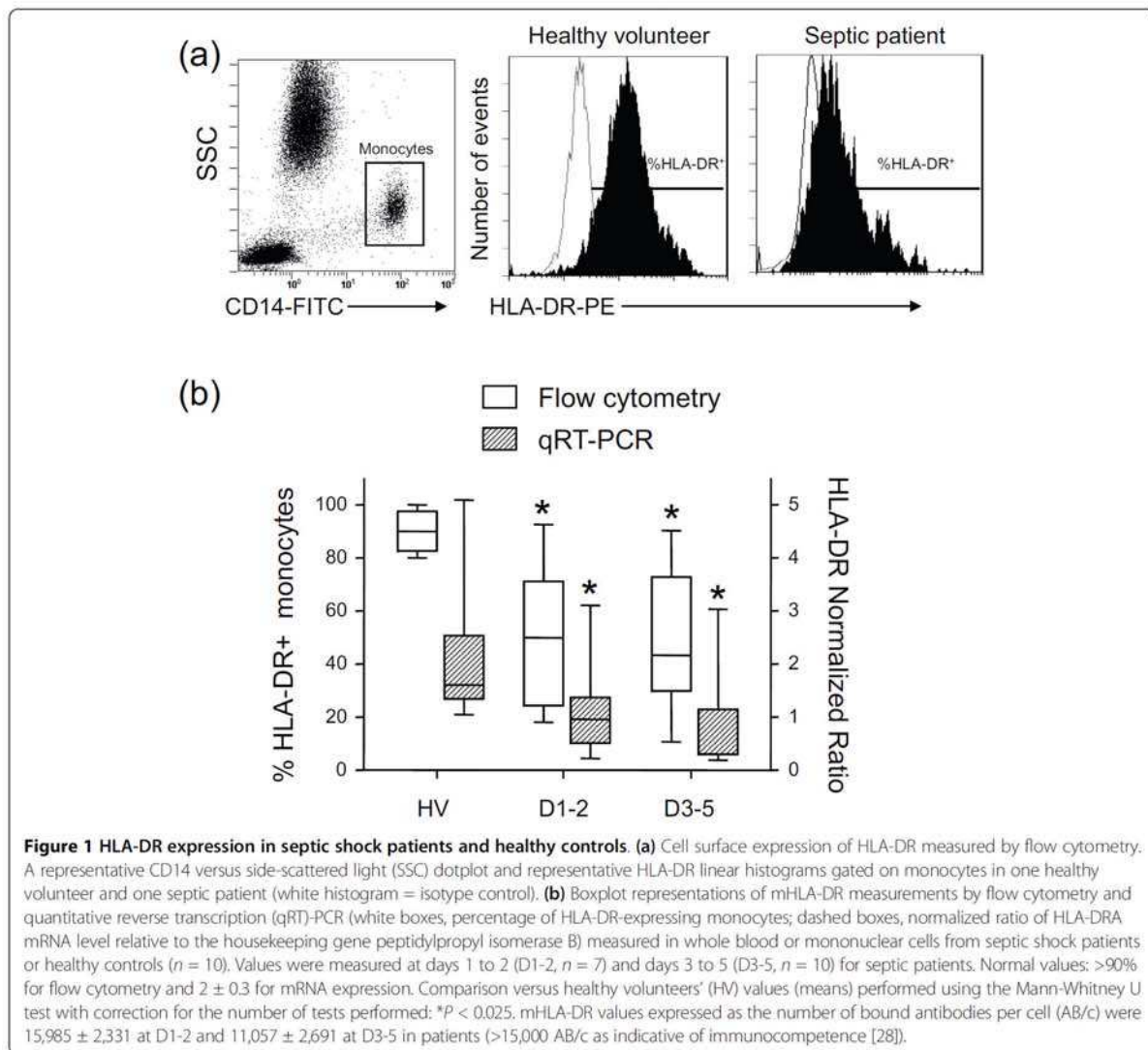


Figure 1 HLA-DR expression in septic shock patients and healthy controls. (a) Cell surface expression of HLA-DR measured by flow cytometry. A representative CD14 versus side-scattered light (SSC) dotplot and representative HLA-DR linear histograms gated on monocytes in one healthy volunteer and one septic patient (white histogram = isotype control). (b) Boxplot representations of mHLA-DR measurements by flow cytometry and quantitative reverse transcription (qRT)-PCR (white boxes, percentage of HLA-DR-expressing monocytes; dashed boxes, normalized ratio of HLA-DRA mRNA level relative to the housekeeping gene peptidylpropyl isomerase B) measured in whole blood or mononuclear cells from septic shock patients or healthy controls ($n = 10$). Values were measured at days 1 to 2 (D1-2, $n = 7$) and days 3 to 5 (D3-5, $n = 10$) for septic patients. Normal values: $>90\%$ for flow cytometry and 2 ± 0.3 for mRNA expression. Comparison versus healthy volunteers' (HV) values (means) performed using the Mann-Whitney U test with correction for the number of tests performed: $*P < 0.025$. mHLA-DR values expressed as the number of bound antibodies per cell (AB/c) were $15,985 \pm 2,331$ at D1-2 and $11,057 \pm 2,691$ at D3-5 in patients ($>15,000$ AB/c as indicative of immunocompetence [28]).

anti-CD3, PE-labeled anti-CD4, and ECD-labeled anti-CD8 (Beckman-Coulter). The red cells were lysed on the automated TQ Prep system (Beckman-Coulter). The absolute count was performed using Flow-count fluorospheres according to the manufacturer's recommendations (Beckman-Coulter). Results are expressed as numbers of lymphocytes per microliter of blood.

Statistical analysis

Values are expressed as medians and interquartile ranges (Q1 to Q3). Comparisons between healthy controls and septic shock patients (at D1-2 or D3-5) were made using the nonparametric Mann-Whitney U test, with $P < 0.025$ considered statistically significant with correction by the number of tests performed.

Results

Characteristics of the septic patient cohort

Thirteen patients with septic shock (six women and seven men) and 15 healthy volunteers (sex-matched and age-matched) were enrolled in the present study. The demographic and clinical characteristics of the cohort are presented in Table 2. None of these patients were immunocompromised (HIV, cancer, immunosuppressive treatments). Seven patients received adjunctive corticosteroid treatment during their ICU stay.

The total number of leukocytes was increased in septic patients at D1-2 and D3-5 compared with healthy volunteers (Mann-Whitney U test; Table 3). In contrast, the total lymphocyte cell count was significantly diminished at D1-2 in shock patients compared with normal

Table 2 Demographic and clinical data for septic shock patients

Parameter	Patients (n = 13)
Age at admission (years)	60 (4)
Gender	
Male	7
MacCabe score	
0	10
1	3
Main diagnosis category	
Medical	8
Surgical	5
SAPS II score at diagnosis of shock	51 (3)
Adjunctive corticosteroid treatment	7
Delay shock - ICU (days)	≤1
Infection diagnosis	
Radiologically diagnosed	1
Surgically diagnosed	0
Microbiologically documented	11
Bacilli Gram-negative	5
Bacilli Gram-positive	6
Fungi	1
Others	1
Type of infection	
Community-acquired	10
Hospital-acquired	3
ICU-acquired	0
Site of infection	
Pulmonary	6
Abdominal	4
Others	3
Mortality	
Survivors	10

Data presented as n or mean (standard error of the mean). ICU, intensive care unit; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II.

values. Regarding circulating lymphocyte subpopulations, a global decrease in T cells (CD4⁺ and CD8⁺) was observed in septic shock patients at D1-2 (Table 3). Our patient cohort was also characterized by a severely reduced percentage of HLA-DR-expressing monocytes measured by flow cytometry and reduced HLA-DRA mRNA expression measured by qRT-PCR in comparison with normal values at D1-2 and at D3-5 (Figure 1b).

Annexin-V binding, caspase-3 and Bcl-2 expressions measured by flow cytometry

We further assessed apoptosis by flow cytometry (Annexin-V binding, active caspase-3 and BCL-2 expressions). We observed a trend toward an increased Annexin-V binding on CD4⁺ T cells and CD19⁺ B cells at D1-2 but no change on CD8⁺ T cells (Figure 2a). This increase became significant at D3-5 on CD4⁺ T cells only.

Active caspase-3 expression, the central caspase in the apoptosis pathway [12], was increased in CD19⁺ cells of septic patients at D3-5 compared with healthy volunteers, but no significant changes were observed in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 2b).

Regarding BCL-2, whatever the time point and T-cell subpopulation investigated, its protein level measured by flow cytometry remained similar to that of healthy controls (Figure 2c).

Pro-apoptotic and anti-apoptotic gene mRNA expressions measured by qRT-PCR

We then analyzed mRNA expressions of the anti-apoptotic genes BCL-2 and BCL-XL in septic shock patients and controls (Figure 3). BCL-2 mRNA expression was slightly decreased in septic shock patients at D1-2 compared with healthy individuals but returned to normal values at D3-5. Surprisingly, BCL-XL mRNA levels were significantly increased in shock patients at both time points compared with healthy volunteers.

We then measured gene expressions for the BAX-like proteins (BAX and BAK), the BH3-only proteins (BID and BIM) and the extrinsic receptor FAS in septic shock patients and healthy volunteers (Figure 4). Only a trend toward increased gene expressions of BAX, BAK and BIM was observed in patients compared with controls (Figure 4a, b, d). A significantly increased BID mRNA expression was measured in patients at D1-2 in comparison with healthy volunteers (Figure 4c).

Concerning FAS mRNA expression, we observed a significant increase in septic patients at D1-2 and D3-5 compared with healthy controls (Figure 4e).

Discussion

Despite studies investigating the role of apoptosis in septic patients and showing a marked increase in circulating lymphocyte apoptosis associated with a profound and persistent lymphopenia and with poor outcome [1,13-15], none have measured programmed-cell death in routine laboratory conditions. The present study was thereby designed to test the capacity of well-known markers of apoptosis to detect this phenomenon on a routine basis in a cohort of septic shock patients.

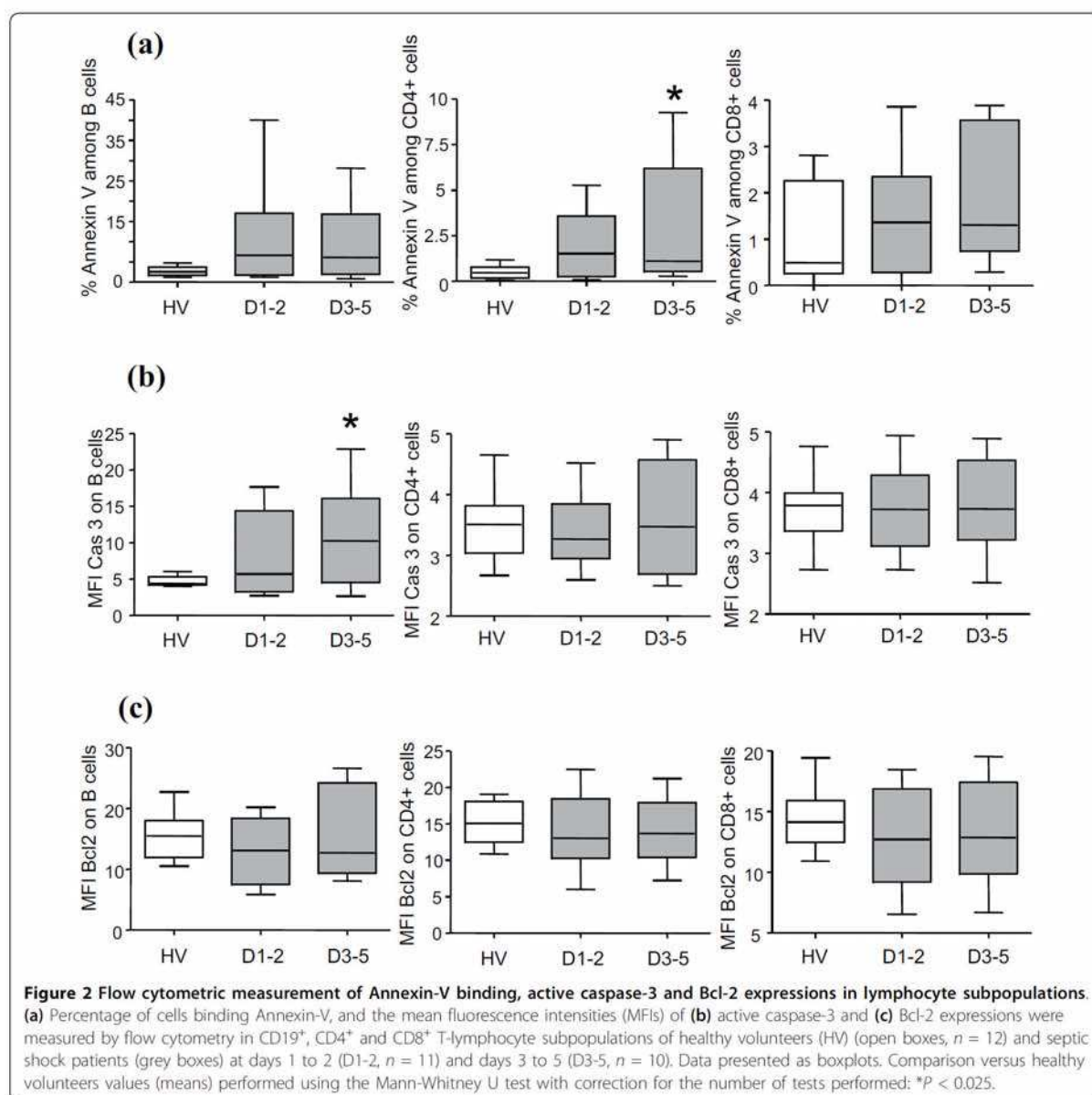
Despite the small size of this cohort, clinical characteristics were similar to those described in the literature for septic shock patients. Moreover, patients were characterized by a decrease in circulating lymphocyte number and a dramatic downregulation of monocyte HLA-DR expression at the protein and mRNA levels in accordance with the literature [10,16].

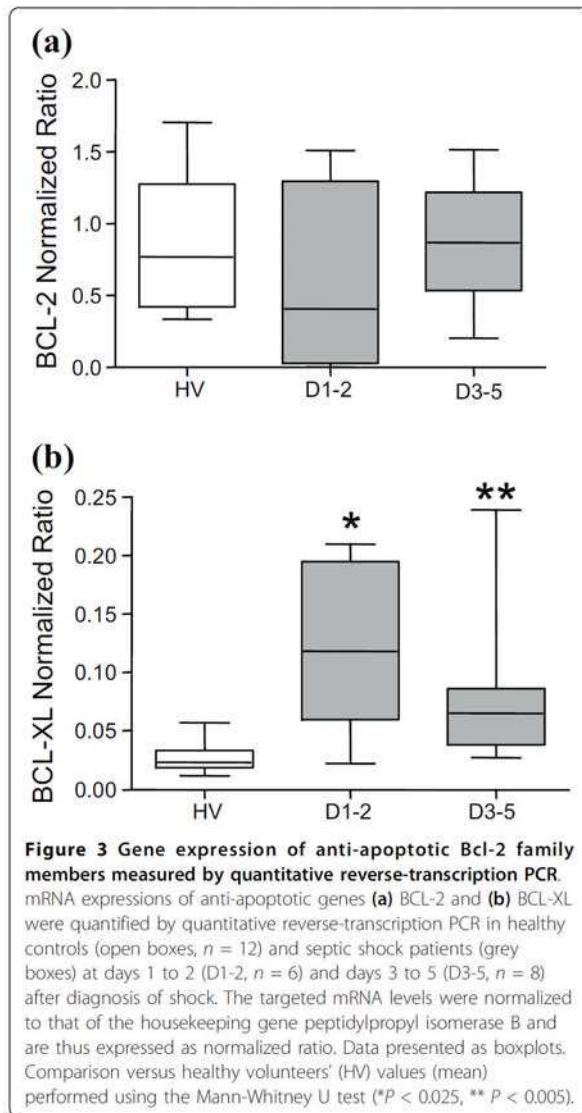
Regarding apoptosis measurement, flow cytometry results showed an increased apoptosis at D3-5 in septic shock patients in CD4⁺ T cells (as indicated by Annexin-V binding) and in B cells (as indicated by

Table 3 Circulating blood leukocyte phenotyping in septic shock patients

	Healthy controls	Septic shock patients	
		Days 1 to 2	Days 3 to 5
Leukocytes	5658 (4,954 to 6,146)	14,673 (9,562 to 18,446)	15,390* (10,097 to 25,235)
Lymphocytes	1549 (1,295 to 1,831)	701* (432 to 1,531)	1,110 (634 to 1,482)
T cells	1090 (902 to 1,470)	421* (209 to 547)	529 (335 to 1,031)
CD4 ⁺ T lymphocytes	890 (569 to 1,141)	220* (115 to 354)	479 (218 to 827)
CD8 ⁺ T lymphocytes	320 (228 to 349)	155* (36 to 207)	158 (70 to 304)

Results expressed as the median (interquartile range, Q1 to Q3) number of cells/ μ l. Blood samples were obtained from 13 septic shock patients at days 1 to 2 and at days 3 to 5 after diagnosis of shock. Circulating leukocyte immunophenotyping was systematically performed by flow cytometry. The following leukocyte subsets were analyzed: total number of leukocytes, total number of lymphocytes, T cells (CD45⁺CD3⁺), and CD4⁺ (CD45⁺CD4⁺CD3⁺) and CD8⁺ (CD45⁺CD8⁺CD3⁺) T-lymphocyte subpopulations. Comparison versus healthy volunteers values (mean) performed using the Mann-Whitney U test with correction for the number of tests performed: * $P < 0.025$.





active caspase 3 staining). These results, however, were not confirmed by the measurement of a decreased BCL-2 expression. In parallel, mRNA expression underlined a surprisingly gradual increase of the BCL-XL gene level until D3-5 compared with healthy controls, a trend toward an increased gene expression of BAX, BAK and BIM, coupled with a massive upregulation of BID and FAS pro-apoptotic genes. Of note, however, no difference in apoptosis markers was observed between patients receiving or not receiving adjunctive corticosteroid treatment (data not shown).

Contrary to other studies measuring apoptosis in septic patients, no clear-cut increase in Annexin-V binding was observed on B cells and CD8⁺ T cells, whereas total lymphocyte and CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte numbers

were decreased in these studies as well as in our study [14,15]. Moreover, no significant decrease in BCL-2 gene expression was observed in our hands. One explanation for these discrepancies may be linked with the difficulties encountered in the monitoring, on a routine basis, of apoptosis in circulating blood of septic shock patients. In particular, the delay between blood drawing in ICU and tube processing in the laboratory (2 hours) may have led to sample deterioration, and could thus explain the slight difference between our results and the literature. Indeed, such problems have been described in a recent study investigating the potential of the measurement of Annexin-V binding on lymphocytes as a biomarker in emergency departments [17].

Regarding mRNA experiments, gene-expression patterns were examined in specific cellular subsets (PBMCs) in the present study rather than in peripheral whole blood cells (total mRNA extracted using the PAXgene™ Blood RNA system (PreAnalytix, Hilden, Germany)) as performed in the study by Weber and colleagues [7]. The initial goal was to avoid possible interference with neutrophils, which are known - contrary to lymphocytes - to present with decreased apoptosis in critically ill patients [18,19]. The second goal was to work with only one blood sample for flow cytometry and qRT-PCR, thereby reducing the volume of blood collected from patients. The counterpart, however, is that the process of PBMC purification increases the delay between blood sampling and mRNA extraction (3 hours), and thus might have further increased sample deterioration. This is indeed illustrated in the present study by the high number of missing values in qRT-PCR experiments due to the low mRNA extraction yield. Another drawback may be that PBMCs still constitute a mixture of several cell subpopulations (monocytes and various lymphocyte subsets). As these subpopulations could have different apoptotic responses after sepsis, this could limit the value of the direct comparison between qRT-PCR and flow cytometry results. If we are to develop a biomarker of apoptosis usable on a routine basis, however, single cell-population purification is not possible (time and blood consuming). PAXgene™ tubes may thus appear the appropriate technique for mRNA study in human blood although they similarly present limitations, including mixed cell populations and an overabundance of globin gene expression.

With that said, in the current study the expressions of the pro-apoptotic genes BID and FAS were markedly upregulated in septic shock patients. This upregulation suggests that, as opposed to the markers listed before, BID and FAS might be robust biomarkers of apoptosis in routine sampling conditions. In Weber and colleagues' article, a similar induction of BID gene expression was observed in early severe septic patients compared with critically ill patients [7]. Moreover, in experimental

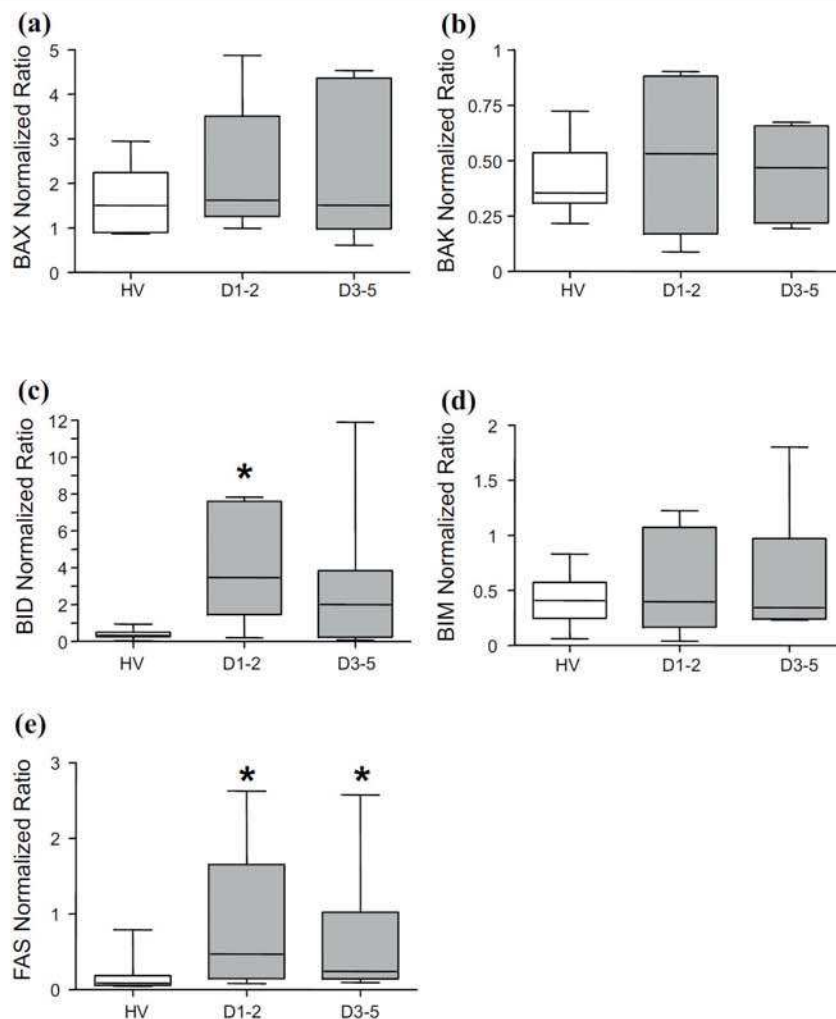


Figure 4 Gene expression of pro-apoptotic Bcl-2 family members and death receptor FAS measured by qRT-PCR. mRNA expressions of pro-apoptotic genes **(a)** BAX, **(b)** BAK, **(c)** BID, **(d)** BIM and **(e)** FAS were quantified by quantitative reverse-transcription PCR in healthy volunteers (HV) (open boxes, $n = 11$) and septic shock patients (grey boxes) at days 1 to 2 (D1-2, $n = 6$) and days 3 to 5 (D3-5, $n = 8$). The targeted genes mRNA levels were normalized to that of the housekeeping gene peptidylpropyl isomerase B. Data presented as boxplots. Comparison versus healthy volunteers values (mean) performed using the Mann-Whitney U test ($*P < 0.025$).

models of sepsis, BID knockout mice showed nearly complete protection from sepsis-induced lymphocyte apoptosis and a marked survival advantage in polymicrobial sepsis [20,21].

Regarding FAS, an increased expression was observed on leukocytes, particularly on neutrophils and monocytes, of humans treated with endotoxin [22]. In septic patients, PBMCs also exhibited an increase in FAS and FAS ligand expressions, in correlation with mortality [23]. Moreover, studies have shown that inhibiting the FAS-mediated apoptotic pathway (FAS-ligand-deficient mice or administration of a FAS fusion protein) reduced

mortality in an experimental model of sepsis [20,24,25]. Similarly, FAS inhibition by siRNA given 30 minutes after cecal ligation and puncture improved survival by up to 50% and reduced apoptosis and organ damages in both the liver and the spleen [26].

Conclusions

Lymphocyte depletion, in part due to apoptosis, has been suggested to play an essential role in the pathophysiology of sepsis [5,6], and numerous studies suggest that targeting apoptosis could thus represent a potential innovative therapeutic strategy in septic shock [5,6,27]. A step

necessary before the use of such therapy in septic patients, however, is to develop biomarkers of apoptosis available on a routine basis to identify patients who could benefit from this treatment before its initiation (that is, patient stratification). Our results underline the difficulties encountered in the monitoring of apoptosis in septic shock patients in routine laboratory conditions, whereas the usual markers of immunoparalysis, such as decreased monocyte HLA-DR expression, are easily detected (both at protein and mRNA levels) in the same sampling conditions. This observation suggests it is crucial to develop specific robust and reliable tools for apoptosis monitoring in septic patients to ensure clinical sample quality in routine laboratory conditions. Among the markers tested in the present study, BID and FAS mRNA expressions appear promising candidates. This deserves to be confirmed in a larger and ideally multicentric clinical study.

Key messages

- Routine monitoring of apoptosis in septic shock patients deserves specific protocols.
- Septic patients present with decreased monocyte HLA-DR expression and lymphopenia.
- Among parameters measured in this article, FAS and BID mRNA appear to be promising apoptosis markers in septic shock.

Abbreviations

BAK: BCL2 antagonist killer; BAX: BCL2-associated \times protein; BCL2: B-cell lymphoma 2; BCL-XL: B-cell lymphoma - extra large; BID: BH3-interacting domain death agonist; BIM: BCL2-interacting protein BIM; D1-2: days 1 to 2; D3-5: days 3 to 5; HLA: human leukocyte antigen; ICU: intensive care unit; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; PBS: phosphate-buffered saline; PCR: polymerase chain reaction; PPIB: peptidylpropyl isomerase B; qRT: quantitative reverse transcription; TNF: tumor necrosis factor.

Acknowledgements

The authors would like to thank A Portier for technical assistance and M Provent for clinical data recording. The present work has been supported by funds from the Hospices Civils de Lyon and DGOS-INSERM "Recherche Clinique Translationnelle 2009", the French Ministry of Health (PHRC 2008) and FINOVI (Fondation Innovations en Infectiologie), and was conducted thanks to the logistical support (H Thizy, F Gueyffier) of the Centre d'Investigation Clinique (Clinical Research Center) of Inserm and Hospices Civils de Lyon. This project is part of Advanced Diagnostics for New Therapeutic Approaches, a program dedicated to personalized medicine, coordinated by Mérieux Alliance and supported by the French public agency, OSEO.

The present work belongs to a global study on ICU-induced immune dysfunctions. The study has been approved by our Institutional Review Board for ethics (Comité de Protection des Personnes) and registered at French Ministry of Research and Enseignement (#DC-2008-509). The study is also recorded at the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés.

Author details

¹Joint Unit Hospices Civils de Lyon - bioMérieux, Hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval, 69437 Lyon cedex 03, France. ²Hospices Civils de Lyon - Immunology Department, Hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval, 69437 Lyon cedex 03, France. ³Hospices Civils de Lyon - Intensive Care Unit, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre-Bénite, France.

Authors' contributions

FT-D and FV conceived the study, participated in its design and data analysis, and drafted the manuscript. FV and CG established the flow cytometric methodology, and participated in data acquisition and analysis. AL was involved in clinical sample and data acquisition. FT-D established the PCR methodology and the analysis, and designed the primers. GM participated in the study design. FV, GM and BM revised the manuscript for intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 18 March 2010 Revised: 9 June 2010 Accepted: 13 July 2010
Published: 13 July 2010

References

1. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003, **348**:138-150.
2. Munford RS, Pugin J: Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**:316-321.
3. Pugin J: Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp* 2007, **280**:21-27.
4. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A: Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 2008, **14**:64-78.
5. Hotchkiss RS, Nicholson DW: Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:813-822.
6. Ayala A, Wesche-Soldato DE, Perl M, Lomas-Neira JL, Swan R, Chung CS: Blockade of apoptosis as a rational therapeutic strategy for the treatment of sepsis. *Novartis Found Symp* 2007, **280**:37-49.
7. Weber SU, Schewe JC, Lehmann LE, Müller S, Book M, Klaschik S, Hoeft A, Stüber F: Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. *Crit Care* 2008, **12**:R128.
8. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL: The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992, **101**:1481-1483.
9. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F: A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993, **270**:2957-2963.
10. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P: Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006, **32**:1175-1183.
11. Pachot A, Blond JL, Mouglin B, Miossec P: Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood. *J Biotechnol* 2004, **114**:121-124.
12. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL: Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001, **15**:879-892.
13. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999, **27**:1230-1251.
14. Felmet KA, Hall MW, Clark RS, Jaffe R, Carcillo JA: Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol* 2005, **174**:3765-3772.
15. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Armiot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drénoü B: Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002, **18**:487-494.
16. Pachot A, Monneret G, Brion A, Venet F, Bohé J, Bienvenu J, Mouglin B, Lepape A: Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med* 2005, **33**:31-38.
17. Greineder CF, Nelson PW, Dressel AL, Erba HP, Younger JG: In vitro and in silico analysis of annexin V binding to lymphocytes as a biomarker in emergency department sepsis studies. *Acad Emerg Med* 2007, **14**:763-771.
18. Elsakka N, Galley HF, Sharaki O, Helmy M, Marsouk S, Sedrak M, Webster NR: Delayed apoptosis in patients with multiple organ dysfunction. *Crit Care Shock* 2006, **9**:9-15.

19. Aldridge AJ: Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg* 2002, **168**:204-214.
20. Chang KC, Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, Hotchkiss RS: Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. *FASEB J* 2007, **21**:708-719.
21. Chen Y, Chung CS, Wilson D, Jones L, Ayala A: The role of BID protein in sepsis induced apoptosis. *Shock* 2005, **23**(Suppl 3):47.
22. Marsik C, Halama T, Cardona F, Wlassits W, Mayr F, Pleiner J, Jilma B: Regulation of Fas (APO-1, CD95) and Fas ligand expression in leukocytes during systemic inflammation in humans. *Shock* 2003, **20**:493-496.
23. Papathanassoglou ED, Moynihan JA, McDermott MP, Ackerman MH: Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival. *Crit Care Med* 2001, **29**:709-718.
24. Chung CS, Xu YX, Wang W, Chaudry IH, Ayala A: Is Fas ligand or endotoxin responsible for mucosal lymphocyte apoptosis in sepsis? *Arch Surg* 1998, **133**:1213-1220.
25. Chung CS, Song GY, Lomas J, Simms HH, Chaudry IH, Ayala A: Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. *J Leukoc Biol* 2003, **74**:344-351.
26. Wesche-Soldato DE, Chung CS, Lomas-Neira J, Doughty LA, Gregory SH, Ayala A: In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood* 2005, **106**:2295-2301.
27. Schwulst SJ, Muenzer JT, Peck-Palmer OM, Chang KC, Davis CG, McDonough JS, Osborne DF, Walton AH, Unsinger J, McDunn JE, Hotchkiss RS: Bim siRNA decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *Shock* 2008, **30**:127-134.
28. Döcke WD, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk HD, Kunz D: Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 2005, **51**:2341-2347.

doi:10.1186/cc9181

Cite this article as: Turrel-Davin *et al.*: Upregulation of the pro-apoptotic genes BID and FAS in septic shock patients. *Critical Care* 2010 **14**:R133.

8. Assessment of plasmatic immunoglobulin G, A and M levels in septic shock patients

Fabienne Venet, Rémi Gebeile, Julien Bancel, Caroline Guignant, Françoise Poitevin-Later, Christophe Malcus, Alain Lepape, Guillaume Monneret.

Int Immunopharmacol 2011, doi:10.1016/j.intimp.2011.08.024

A ce jour, dans le cadre des thérapeutiques destinées aux patients en sepsis sévère, il n'existe pas de traitement reconnu et validé pour lutter contre les dysfonctions immunitaires qui se mettent en place. Différents traitements sont à l'étude : c'est le cas par exemple de l'administration en intraveineuse d'immunoglobulines (Ig) polyvalentes, mais leur intérêt reste actuellement controversé. Plusieurs raisons expliquent cette situation : de faibles cohortes de patients inclus dans les essais, des doses d'Ig très variables d'une étude à l'autre (or les effets pro- ou anti-inflammatoires sont dose-dépendants) et l'absence de stratification biologique (i.e. : dosage des Ig circulantes à l'inclusion des patients). Dans ce contexte, nous avons mesuré les concentrations en Ig A, G et M dans une cohorte de patients en choc septique la première semaine après le choc (aux jours J1-2, J3-4 et J5-7).

Nous avons observé que dans les quatre premiers jours après le choc, les patients présentent une diminution des concentrations en Ig G et Ig M (mais pas en Ig A) et une augmentation de ces valeurs avec le temps. Cette évolution en Ig n'apparaît pas associée à la mortalité ou la sévérité de l'atteinte. Les concentrations en Ig de chacune des trois classes sont corrélées avec les concentrations plasmatiques en protéines. Ainsi l'hypogammaglobulinémie apparente serait donc le reflet d'une hémodilution. Ce résultat n'est pas en faveur de l'utilisation d'une telle thérapeutique à doses substitutives. Si l'objectif thérapeutique de l'administration des Ig sériques à fortes doses est d'induire une réponse anti-inflammatoire, l'évaluation de la dysfonction immunitaire devra être impérativement réalisée au préalable.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp

Assessment of plasmatic immunoglobulin G, A and M levels in septic shock patients

Fabienne Venet^{a,c}, Rémi Gebeile^a, Julien Bancel^a, Caroline Guignant^{a,c}, Françoise Poitevin-Later^a,
Christophe Malcus^a, Alain Lepape^{b,c}, Guillaume Monneret^{a,c,*}

^a Hospices Civils de Lyon, Immunology Laboratory, Hop E Herriot, 69437 Lyon, France

^b Hospices Civils de Lyon, Intensive Care Units, Centre Hospitalier Lyon-Sud, 69495 Pierre-Bénite, France

^c Hospices Civils de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, EAM 4174, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 June 2011

Received in revised form 29 August 2011

Accepted 29 August 2011

Available online xxx

Keywords:

Immunoglobulin

IgG

IgA

IgM

Septic shock

Sepsis

ABSTRACT

Polyvalent immunoglobulin (Ig) therapy has been tested as adjunctive treatment in sepsis and septic shock, but its efficacy is still a matter of debate. This has been explained because clinical trials were mostly performed on small numbers of patients. Moreover, the endogenous level of circulating Ig in patients was never taken into account. In this study, plasmatic Ig classes and protein concentrations were measured at Days (D) 1–2, D3–4 and D5–7 in 62 septic shock patients. At D1–2 as well as at D3–4, patients presented with a significant reduction of plasmatic IgG concentrations. Indeed, at D1–2, 61% of the patients had IgG level below the lowest limit of our age-matched reference values. Plasmatic IgM levels were decreased as well in comparison with reference values from the lab whereas IgA concentrations were not modified. Circulating IgG and IgM concentrations tends to increase overtime. Indeed, at D5–7, most patients (61%) had IgG and IgM levels within the range of normal values. These alterations did not appear to be associated with increased mortality, morbidity or severity after septic shock. However, at D1–2 and D3–4, decreased circulating Ig level was significantly correlated with reduced plasmatic protein concentrations. Overall, our results suggest that an apparent hypogammaglobulinemia is present at D1–2 and D3–4 in septic shock patients, which seems to be related with reduced circulating protein concentration after septic shock. These results need to be confirmed in a larger cohort of patients.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Severe sepsis and septic shock are common indications for admission to intensive care units (ICUs) and the leading cause of morbidity and mortality for critically ill patients worldwide [1]. Although an enormous effort has been expended during the last 20 years to find new therapies that decrease the mortality of this syndrome, the overall success rate has been disappointing and the morbidity and mortality of this disease are still unacceptably high [2]. Severe sepsis and septic shock affect for example millions of individuals around the world each year, killing one in four [1]. Recently, several meta-analyses have evoked a potential role for intravenous polyvalent

immunoglobulin (IVIG) treatment in reducing mortality after severe sepsis and septic shock [3,4]. IVIG is a blood product prepared from a pool of donors and frequently used for the treatment of neurologic, hematologic, immunologic, nephrologic, and rheumatologic diseases. IVIG preparations contain more than 90% of IgG and can be divided into those that also contain IgM and IgA or those depleted of these two classes (i.e. containing only IgG). Because human plasma contains all three immunoglobulin classes, the IgM/A-containing IVIG has been suggested to be more physiological [5]. In experimental studies, it was shown that polyvalent Ig can improve opsonization, prevent nonspecific complement activation, protect against the antibiotic-induced liberation of endotoxin and neutralize endotoxin as well as a wide variety of superantigens [4]. However, this efficacy has failed to translate into clinical trials and recent consensus guidelines do not recommend the use of IVIG in septic patients [6]. This failure has been explained because clinical trials were mostly performed on a small number of patients and most of them did not have the power to detect significant differences in patients' outcome [4]. Moreover, none of these trials investigated the endogenous level of circulating Ig in septic shock patients. The objective of this study was therefore to measure the endogenous levels of circulating Ig classes (IgG, IgA and IgM) in a cohort of septic shock patients.

Abbreviations: Ig, Immunoglobulin; ICU, Intensive Care Unit; IVIG, intravenous polyvalent immunoglobulin; HLA-DR, Human Leukocyte Antigen-DR; D, Day; SAPS II, Simplified Acute Physiologic Score II; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment Score.

* Corresponding author at: Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, Pavillon E, 5 place d'Arsonval, 69437 LYON Cedex 03, France. Tel.: +33 4 72 11 97 58; fax: +33 4 72 11 97 53.

E-mail address: guillaume.monneret@chu-lyon.fr (G. Monneret).

1567-5769/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.intimp.2011.08.024

Please cite this article as: Venet F, et al, Assessment of plasmatic immunoglobulin G, A and M levels in septic shock patients, *Int Immunopharmacol* (2011), doi:10.1016/j.intimp.2011.08.024

2. Patients and methods

2.1. Patients

The study group consisted in 62 consecutive patients with septic shock according to the diagnostic criteria of the American College of Chest Physician/Society of Critical Care Medicine [7]. The only exclusion criteria were patients under the age of 18 years old and subjects with aplasia. Septic shock was defined by an identifiable site of infection, hypotension persisting despite fluid resuscitation and requiring vasopressor therapy, and evidence of a systemic inflammatory response manifested by at least two of the following criteria: a) temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$; b) heart rate >90 beats/min; c) respiratory rate >20 breaths/min; d) white blood cell count $>12000/\text{mm}^3$ or $<4000/\text{mm}^3$. Severity was assessed by the Simplified Acute Physiologic Score II (SAPS II) calculated at inclusion in the protocol [8]. Development of organ dysfunction was assessed by the Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA, range: 0–24) measured after 24 h of ICU stay [9]. Mortality was defined as death occurring within 28 days after the onset of shock. The onset of septic shock was defined as the beginning of vasopressor therapy. None of these patients was treated by intravenous Ig or albumin substitution. This study was reviewed by the institutional ethics committee. This committee waived the need for informed consent because Ig measurements were performed on residual blood after completing routine follow-up performed in our two ICUs.

2.2. Plasmatic immunoglobulin classes and total protein measurements

Because the lab did not operate on Saturdays and Sundays, patients were included on week days during working hours and blood samples for immunoglobulin measurements were obtained on days 1–2 (D1–2, $n=44$), days 3–4 (D3–4, $n=62$) and days 5–7 (D5–7, $n=18$) after the onset of shock on EDTA-anticoagulated tubes. Patients were sampled twice during the first week after the onset of shock: either at D1–2 and D3–4 ($n=44$) or at D3–4 and D5–7 ($n=18$). No patient was sampled at the 3 time-points. Moreover, due to a technical problem (insufficient volume of plasma), IgM concentration could not be measured at D3–4 in one patient. Immunoglobulin classes (IgG, IgA and IgM) were measured by nephelometry (IMMAGE Immunochemistry systems, Beckman-Coulter, Hiialeah, FL) and total plasmatic protein concentration was measured by an automated colorimetric reaction (MODULAR, Roche, Basel, Switzerland). Age-matched reference values were 60 to 76 g/l for plasmatic protein concentration, 6.5 to 12.25 g/l for IgG, 0.8 to 3.5 g/l for IgA and 0.5 to 1.5 g/l for IgM (as provided by clinical chemistry lab of our hospital and in accordance with international consensus values). Reference values for the ratio Ig/protein were calculated by dividing reference values for Ig levels by reference values for protein concentration.

2.3. Statistics

Results are presented as box-plots with individual values. Lower and higher limits for the reference values are shown as dot lines. Comparisons vs reference values (medians) were performed using the Signed Rank Sum test, whereas comparisons between groups were made using the non-parametric Mann Whitney *U*-test (survivors vs non-survivors). The non-parametric Wilcoxon paired test was used to assess variations between time points. The Spearman correlation test was used to assess correlations between Ig values and SAPS II scores measured on admission and between Ig values and plasmatic protein concentrations. A *p* value <0.05 was considered as statistically significant with correction by the number of tests performed. The analyses were performed using Sigma Stat software (version 3.5, Systat Software, Chicago, IL).

3. Results

Sixty two patients with septic shock were included in this study. Clinical data are presented in Table 1. Median age was 72 years, median SOFA score within the first 24 h after admission was 10 and median SAPS II score at diagnosis was 52. Twenty-eight day mortality was 23% (Table 1). Median (Q1–Q3) time of death after diagnosis of shock was 16.5 days (9–27) and only 3 patients died before D8 (one at D3, one at D4 and one at D8).

At D1–2 as well as at D3–4, patients presented with a significant reduction of circulating IgG levels in comparison with reference values from the lab (Fig. 1A). Indeed, in this group of patients at D1–2, 61% had IgG concentration below the lowest limit of our age-matched reference values (Table 2). Similarly, circulating IgM levels were decreased at D1–2 and D3–4 (Fig. 1C), whereas IgA concentrations were not diminished in septic shock patients in comparison with reference values from the lab (Fig. 1B). In contrary, at D5–7, most remaining patients had IgG (61%) and IgM (83%) concentrations within the range of normal values or higher (Fig. 1A and C).

We also observed that Ig concentrations tend to increase overtime. A significant increase was observed between D3–4 and D5–7 for IgG levels and between D1–2 and D3–4 for IgA (Wilcoxon paired test – data not shown). This is also illustrated by an overtime decrease in the percentages of patients with low IgG, IgM and IgA concentrations (Table 2).

No significant differences were observed between values measured in survivors and non-survivors (Fig. 2) and no correlations were measured between Ig class concentrations measured either at

Table 1

Demographic, clinical and biological data for septic shock patients. For categorical data, results are presented as number of cases and, between brackets, as percentages respective to the total population. For continuous data (*), results are presented as Medians and interquartile ranges [Q1–Q3]. SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II measured on admission. SOFA: Sequential Organ Failure Assessment measured during the first 24 h of ICU stay.

Parameters	Patients (n = 62)
Age at admission (years)*	72 [62–80]
Gender	
Male	39 (63)
SAPS II at diagnosis of shock*	52 [42–64]
SOFA Score*	10 [9–13]
Mac Cabe score	
0	41 (66)
1	17 (27)
2	4 (2)
ICU stay (days)*	18 [18–31]
Duration of intubation (days)*	12 [7–27]
Delay shock-ICU (days)*	0 [0–1]
Main diagnosis category	
Medical	28 (45)
Surgery	34 (55)
Infection	
Diagnosis	
Suspected	2 (3)
Radiology	5 (8)
Surgery	7 (11)
Microbiology documented	48 (77)
Bacilli Gram–	30 (48)
Cocci Gram+	28 (45)
Fungi	6 (10)
Others	9 (15)
Type of infection	
Community acquired	38 (61)
Nosocomial in hospital	19 (31)
Nosocomial in ICU	5 (8)
Site of infection	
Pulmonary	24 (39)
Abdominal	27 (44)
Others	11 (18)
28-day mortality	
Non-survivors	14 (23)

Please cite this article as: Venet F, et al, Assessment of plasmatic immunoglobulin G, A and M levels in septic shock patients, Int Immunopharmacol (2011), doi:10.1016/j.intimp.2011.08.024

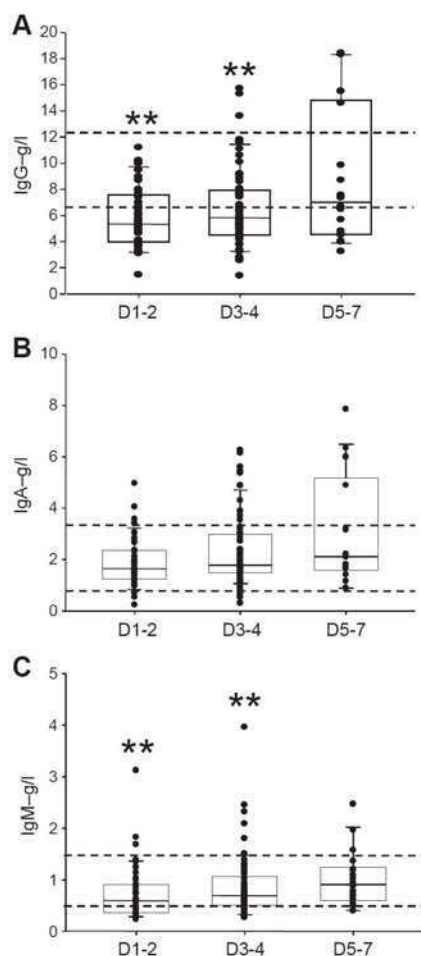


Fig. 1. Immunoglobulin class dosages in septic shock patients. Sixty-two septic shock patients were included in the study. Patients were included on week days during working hours and blood samples for immunoglobulin measurements were obtained on days 1–2 (D1–2, n = 44), days 3–4 (D3–4, n = 62) and days 5–7 (D5–7, n = 18) after the onset of shock in EDTA-anticoagulated tubes. Results are presented as box-plots as well as individual values. Normal values from the lab are shown as dot lines. Comparisons vs normal values (medians) were performed using the Signed Rank Sum test (** p < 0.0001).

D1–2 or D3–4 and SAPS II scores measured on admission, SOFA scores calculated over the first 24 h of ICU stay or intubation length (data not shown). No significant differences were observed in Ig levels regarding the type or site of initial infection (data not shown).

Finally, since septic shock patients received a high volume of resuscitation fluids to maintain their blood pressure, total plasmatic protein concentration was measured in an attempt to estimate hemodilution as related to plasma volume expansion. Indeed, we observed that plasmatic protein concentration was significantly decreased in

Table 2

Numbers and percentages of septic patients with low immunoglobulin class levels. Values are expressed as numbers of patients and percentages between brackets.

	Low limit of age-matched normal values	Days 1–2	Days 3–4	Days 5–7
IgG	<6.5 g/l	27 (61%)	32 (52%)	7 (39%)
IgM	<0.5 g/l	17 (40%)	13 (21%)	3 (17%)
IgA	<0.8 g/l	4 (9%)	3 (5%)	0 (0%)

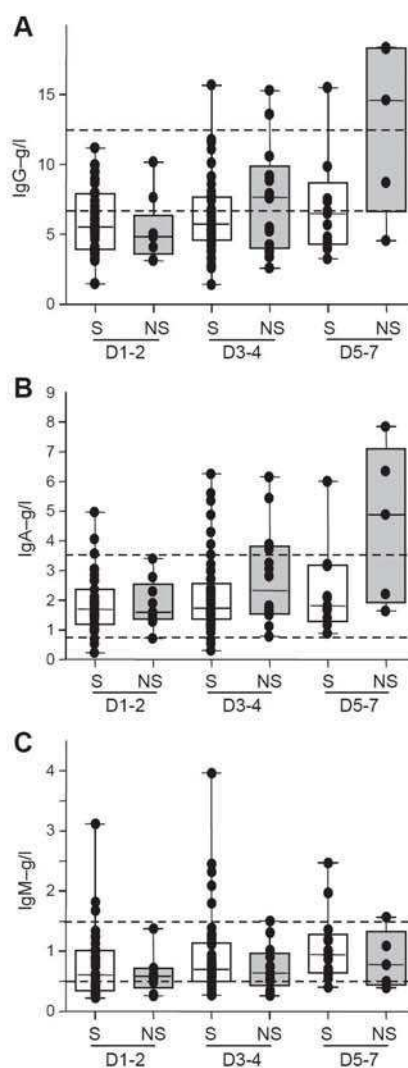


Fig. 2. Immunoglobulin class dosages in survivors and non survivors. Sixty-two septic shock patients were included in the study. Patients were included on week days during working hours and blood samples for immunoglobulin measurements were obtained on days 1–2 (D1–2, n = 44), days 3–4 (D3–4, n = 62) and days 5–7 (D5–7, n = 18) after the onset of shock in EDTA-anticoagulated tubes. Results in Survivors (S – white boxes) vs Non-Survivors (NS – gray boxes) are presented as box-plots as well as individual values. Normal values from the lab are shown as dot lines. No significant differences were observed between S and NS at all time points (non-parametric Mann Whitney U-test).

patients at every time points and showed not significant variation overtime (Fig. 3A). Interestingly, at D1–2, we observed a significant correlation between concentrations of each Ig class and plasmatic protein levels (Fig. 3B–C–D). This correlation was also present at D3–4 for all Ig classes and at D5–7 for IgG and IgA (data not shown). Interestingly, when circulating Ig levels were corrected by corresponding plasmatic protein concentrations, ratios returned with the range of normal values for IgG and IgM and were even increased for IgA (Fig. 3E–F–G). Regarding overtime variations, we observed that Ig/protein ratios tend to increase overtime, with a significant increase between D3–4 and D5–7 for IgG and between

Please cite this article as: Venet F, et al, Assessment of plasmatic immunoglobulin G, A and M levels in septic shock patients, Int Immunopharmacol (2011), doi:10.1016/j.intimp.2011.08.024

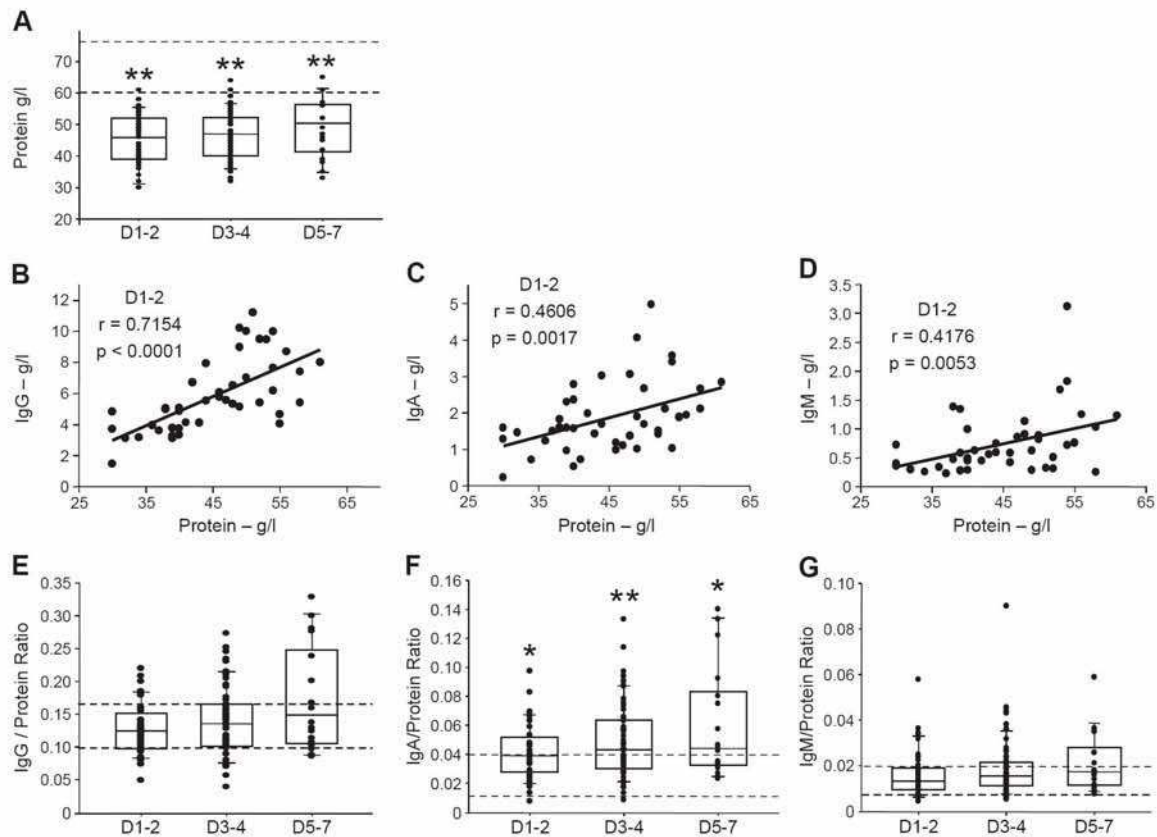


Fig. 3. Correlation between immunoglobulin class levels and plasmatic protein concentration in septic shock patients. Sixty-two septic shock patients were included in the study. Patients were included on week days during working hours and blood samples for immunoglobulin measurements were obtained on days 1–2 (D1–2, $n = 44$), days 3–4 (D3–4, $n = 62$) and days 5–7 (D5–7, $n = 18$) after the onset of shock on EDTA-anticoagulated tubes. Results are presented as box-plots as well as individual values. Normal values from the lab are presented as dot lines. A. Total plasmatic protein dosages are shown for septic shock patients. B–C–D correlations between Ig levels and protein concentrations measured at D1–2 are shown (Spearman correlation test). E–F–G ratios between Ig levels and plasmatic protein concentrations are shown. Comparisons vs normal values (medians) were performed using the Signed Rank Sum test (* $p < 0.01$, ** $p < 0.0001$).

D1–2 and D3–4 for IgA (Wilcoxon paired test – data not shown). Once again, neither did we observe any significant difference between survivors and non-survivors, nor any correlation between these ratios and SAPS II scores on admission (data not shown).

4. Discussion

It is generally accepted that circulating Ig levels after severe infection are dramatically diminished and that serum Ig concentrations are often found in the lower normal range in patients with sepsis [10]. However, a careful review of the literature shows that only few recent data are available regarding circulating levels of Ig classes in septic patients [10].

In the current study, we systematically assessed overtime variations of IgG, IgA and IgM circulating levels in a cohort of 62 septic shock patients. IgG and IgM concentrations were significantly diminished in patients at the beginning of shock but rapidly returned within the range of normal values overtime. A significant correlation was measured between plasmatic Ig levels and total protein concentration. However, neither any difference between survivors and non-survivors nor any correlation with severity/morbidity scores measured on admission were observed.

Our results are in accordance with the recently published study by Taccone et al. [11]. In a cohort of 21 septic shock patients, the authors

observed that 76% had hypogammaglobulinemia and 57% hypolIgG at D1 after the onset of shock. Similarly, in their study, hypolIgG was well correlated with hypoalbuminemia but was not correlated with the initial severity of the disease. The authors conclude that hypogammaglobulinemia is common in septic shock patients and persists overtime. Myrianthefs et al., in response to this study, recently observed in 38 septic shock patients that only 31.6% had low IgG concentrations at the beginning of shock [12]. Overall, this suggests that septic patients present with a decreased circulating Ig level at the beginning of sepsis. Interestingly, in the initial study by Taccone et al., all deaths occurred in patients with low IgG concentrations. Moreover, a letter combining results from these 2 studies still showed an increased mortality in low-IgG group [13]. In our cohort, although not significantly, patients with low-Ig levels at admission had higher mortality (26 vs 12%). This suggests that the potential value of D1–2 Ig levels as a prognostic marker in sepsis needs to be further investigated in a larger cohort of patients.

Importantly, this decrease does not appear to be significantly correlated with severity but might be linked with the decrease in total plasmatic protein concentration as a correlation with hypoalbuminemia was observed in Taccone's study as well as in ours [11]. However, as circulating protein concentration in septic shock patients could be regulated due to different factors (hemodilution due to fluid administration, extravasation due to increased microvascular permeability or

secretion alteration in response to inflammation in case of acute phase proteins), this last aspect also needs to be further investigated.

Five recent meta-analyses investigated the effect of IVIG in reducing mortality after sepsis [14,15]. Overall, there appears to be a favorable trend toward a positive effect of IVIG in reducing mortality after severe sepsis. However, the major limitation of these meta-analyses is that they mainly included small studies (less than 50 patients), which were therefore of low quality. Only one large study investigating the effect of IVIG on mortality in sepsis has been published so far, which showed no effect on mortality [16]. Interestingly, in this study, circulating IgG levels were assessed. The authors observed that on D0, mean IgG values were in the low normal range in patients and rose sharply in the IVIG treated group. As in our study, no difference in IgG levels was observed between survivors and non-survivors in the placebo group therefore not supporting the postulated prognostic relevance of plasma IgG level in sepsis [11,17]. Furthermore, no difference in plasma IL-6, TNF-receptor I and II levels were measured between both groups, which is not in favor of an immunomodulatory effect of IVIG in sepsis. To note, this study, which focused on severe sepsis, was performed in 1993 [16]. Data on patients' outcome should thus be interpreted with caution in regard with advances of modern critical care medicine.

Indeed, the mechanism of action of IVIG treatment in sepsis is still a matter of debate. The opsonizing and neutralizing antibodies contained in IVIG have been postulated to work in sepsis by increasing serum bactericidal activity and by neutralizing bacterial endo as well as exotoxins [10]. Another potential mechanism of action of IVIG in sepsis is through their anti-inflammatory/regulatory effect [18]. Regulatory effect of high dose IVIG involves, among others, modifications of pro/anti-inflammatory cytokines release, decreased major histocompatibility complex II expression on innate immune cells, increased differentiation and effector functions of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and decreased circulating lymphocytes' proliferation with increased apoptosis [10,18,19].

This raises the question of the rationale for IVIG therapy in septic shock patients and highlights the complexity of treating such a heterogeneous cohort of patients. It appears that if the goal of IVIG therapy in sepsis is to restore a normal level of circulating IVIG, then treatment may probably be given to those patients that present with transient hypogammaglobulinemia at the beginning of shock. In contrary, if the goal is to induce an anti-inflammatory response/to modulate immune response, then therapeutic administration may be based on the results of a beforehand marker of immune dysfunctions in patients. The necessity of such stratification is comforted by the observation that encouraging results of IVIG administration in septic patients have been reported in well-defined sepsis subgroups [10]. Obviously, these hypotheses need to be confirmed in large clinical trials.

Our study has some limitations. First, differences in patients' inclusion criteria between our study and previous investigations in the field should be mentioned [11]. For example, pre-existent immunological alterations (monoclonal gammopathy or immunoglobulin deficiencies) were not taken into account in the exclusion criteria for this cohort of patients. Moreover, as opposed to Taccone's study, patients included in our study had both community-acquired as well as nosocomial sepsis. Although no differences in Ig levels were observed between patients with community-acquired vs nosocomial septic shock in our study (data not shown), this could explain some discrepancies between our results and previous investigations in the field. Second, patients could not systematically be sampled in our study (leading to missing values for some sampling times). This could obviously impact the evaluation of the overtime kinetic of plasmatic Ig concentrations. Therefore, to definitively test the overtime variation of Ig levels in septic shock, a larger study including a significant number of patients sampled at every time-point should be performed.

In conclusion, in the current study, we observed that an apparent hypogammaglobulinemia is present at D1–2 and D3–4 in septic shock patients. However, this transient hypogammaglobulinemia tends to correct itself spontaneously overtime, does not appear to be associated with increased mortality, morbidity or severity but seems to be related with reduced circulating protein concentration after septic shock.

Acknowledgments

This study was conducted thanks to the logistic and methodological support from the Centre d'Investigation Clinique (Clinical Research Center) of Inserm and Hospices Civils de Lyon. The authors would also like to thank the technical staff of the Immunology laboratory of Hopital E. Herriot – Lyon for their great help in immunoglobulin dosages and Dr Nicolas Voirin for his help in retrieving patients' clinical data.

Sources of support: This work was supported by funds from the Hospices Civils de Lyon, by DHOS-Inserm "Recherche Clinique Translationnelle 2009" (to G.M.), by Fondation Innovation en Infectiologie (FINOVI, to G. M. and F. V.), by the French Ministry of Health (PHRC 2008, to G. M and A.L.). These funding sources had no role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

References

- [1] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138–50.
- [2] Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal SM, Masur H. Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit Care Med* 2008;36:964–6.
- [3] Turgeon AF, Hutton B, Fergusson DA, McIntyre L, Timmouth AA, Cameron DW, et al. Meta-analysis: intravenous immunoglobulin in critically ill adult patients with sepsis. *Ann Intern Med* 2007;146:193–203.
- [4] Kreyman KG, de Heer G, Nierhaus A, Kluge S. Use of polyclonal immunoglobulins as adjunctive therapy for sepsis or septic shock. *Crit Care Med* 2007;35:2677–85.
- [5] Azevedo LC, Park M, Schettino GP. Novel potential therapies for septic shock. *Shock* 2008;30:60–6.
- [6] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008;36:296–327.
- [7] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250–6.
- [8] Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993;270:2957–63.
- [9] Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998;26:1793–800.
- [10] Werdan K. Intravenous immunoglobulin for prophylaxis and therapy of sepsis. *Curr Opin Crit Care* 2001;7:354–61.
- [11] Taccone FS, Storck P, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Gamma-globulin levels in patients with community-acquired septic shock. *Shock* 2009;32:379–85.
- [12] Myrianthefs PM, Boutzouka E, Baltopoulos GJ. Letters to the Editor: "Gamma-globulin levels in patients with community acquired septic shock". *Shock* 2010;33:556–7.
- [13] Taccone FS, Vincent JL. Gamma-globulin levels in patients with community-acquired septic shock. Authors' Reply. *Shock* 2010;33:556–7.
- [14] Alejandria MM, Lansang MA, Dans LF, Mantaring JB. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis and septic shock. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;1:CD001090.
- [15] Laupland KB, Kirkpatrick AW, Delaney A. Polyclonal intravenous immunoglobulin for the treatment of severe sepsis and septic shock in critically ill adults: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2007;35:2686–92.
- [16] Werdan K, Pilz G, Bujdoso O, Fraunberger P, Neeser G, Schmieder RE, et al. Score-based immunoglobulin G therapy of patients with sepsis: the SBITs study. *Crit Care Med* 2007;35:2693–701.
- [17] Cafiero F, Gipponi M, Bonalumi U, Piccardo A, Sguotti C, Corbetta G. Prophylaxis of infection with intravenous immunoglobulins plus antibiotic for patients at risk for sepsis undergoing surgery for colorectal cancer: results of a randomized, multicenter clinical trial. *Surgery* 1992;112:24–31.
- [18] Tha-In T, Bayry J, Metselaar HJ, Kaveri SV, Kwekkeboom J. Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends Immunol* 2008;29:608–15.
- [19] Kessel A, Ammuri H, Peri R, Pavlotzky ER, Blank M, Shoenfeld Y, et al. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J Immunol* 2007;179:5571–5.

Please cite this article as: Venet F, et al. Assessment of plasmatic immunoglobulin G, A and M levels in septic shock patients. *Int Immunopharmacol* (2011), doi:10.1016/j.intimp.2011.08.024

DISCUSSION

1. Synthèse des résultats

1.1. Pro-hormones cardio-vasculaires

Dans la physiopathologie du choc septique, les premières heures sont cruciales (584). Il s'agit d'une urgence thérapeutique (457, 465, 584). Cependant, la population des patients septiques étant très hétérogène, il est difficile de prédire individuellement la réponse à un traitement donné (579), en particulier pour les thérapeutiques les plus coûteuses (ex. : protéine C activée). Les informations cliniques ne permettent pas de résoudre ces problèmes : les symptômes sont non spécifiques et peuvent être trompeurs (ex. : profil hémodynamique d'hyper-débit malgré une dysfonction myocardique) (121). Des scores cliniques de sévérité (ex. : SAPS II (585)) ou de défaillance d'organe (ex. : SOFA (586)) existent, mais sont calculés rétrospectivement car ils nécessitent un recueil de données cliniques sur 24 heures. Ils ne sont donc pas informatifs dans les premières heures du choc. L'apport d'informations précoces, en complément de la clinique, pourrait être fourni par des biomarqueurs.

De très nombreux médiateurs sont libérés dans le sang circulant lors d'un état septique. Près de 180 biomarqueurs ont déjà été étudiés (78). Lors du choc septique, défini par une souffrance cardio-vasculaire, les médiateurs d'origine cardio-vasculaire ou reflétant des anomalies des fonctions cardio-vasculaires, constituent des biomarqueurs d'intérêt. Plusieurs ont déjà été étudiés tels que le BNP, le *N Terminal*-proBNP ou les troponines cardiaques (troponine T et I). Des résultats intéressants ont été obtenus en termes de détection de dysfonction myocardique (ex. : baisse de la fraction d'éjection du ventricule gauche ou de l'index cardiaque) et de prédiction de la mortalité de patients septiques (149, 180, 181, 587-589). Cependant de nombreuses études ont été menées sur des petites cohortes de patients (149), dans certaines études ces marqueurs n'étaient pas associés à la mortalité des patients septiques (590, 591) et des facteurs autres que cardiaques peuvent influencer sur la libération de ces marqueurs, en particulier pour le BNP (150, 592). La recherche de marqueurs alternatifs ou complémentaires à ces derniers est donc justifiée.

Nous nous sommes intéressés à quatre précurseurs d'hormones vasoactives : CT-proET-1, CT-proAVP, MR-proADM et MR-proANP pour leur valeur prédictive de la mortalité (**articles 1 et 2**). Brièvement, à la phase précoce du choc (Jour [J] 1-2 après le choc), MR-proADM et CT-proAVP étaient les deux pro-hormones apportant le plus d'informations sur la mortalité (AUC à 0,71 et 0,76 respectivement). Dans une analyse multivariée, après ajustement sur les variables cliniques, l'association de ces deux pro-hormones donnait les

meilleurs résultats (OR : 5,5 ; IC95% : 1,2-24,7 ; p=0,026). Une semaine après le choc, MR-proADM et MR-proANP étaient les deux pro-hormones les plus informatives sur la mortalité (AUC à 0,86 et 0,78 respectivement). Au contraire, aucune information prédictive n'a été apportée par proET-1 quel que soit le temps du monitoring.

Dans la littérature, ces quatre précurseurs d'hormones ont été étudiés dans des cohortes assez hétérogènes : des patients atteints de pneumopathies à différents niveaux de sévérité (200, 593-595) ou des petites cohortes de patients à différents stades des syndromes septiques (SIRS, sepsis, sepsis sévère ou choc septique) (199, 203, 596).

Concernant les pneumopathies, les concentrations en pro-hormones sont en général associées à la sévérité de l'atteinte évaluée par des scores (par exemple *Pneumonia severity index* [PSI]) (198, 200, 202, 593-595, 597-600). Pour la valeur prédictive de la mortalité à 28 jours, les valeurs des AUC (obtenues après analyse ROC) étaient de l'ordre de 0,76 à 0,84 pour MR-proADM (198, 593, 601, 602), 0,69 à 0,81 pour MR-proANP (202, 594, 595, 600-603), 0,68 à 0,86 pour CT-proAVP (202, 594, 597, 602, 603) et 0,64 à 0,78 pour CT-proET-1 (200, 602). Deux études récentes ont comparé la valeur prédictive de la mortalité de ces quatre pro-hormones simultanément dans deux cohortes de patients avec une atteinte pulmonaire (plus de 700 patients chacune) : MR-proADM (599, 601) et MR-proANP (601) étaient les deux pro-hormones les plus informatives.

Quelques études ont été menées dans des cohortes de patients comprenant des SIRS, sepsis, sepsis sévère et choc septique. La concentration des pro-hormones augmentait avec la sévérité du stade septique pour les quatre pro-hormones (199, 204, 596). La valeur prédictive de la mortalité (à 28 jours) a été calculée pour l'ensemble des patients septiques (tout stade confondu) et évaluée par le calcul des AUC. Les résultats étaient du même ordre que ceux obtenus dans notre étude : AUC compris entre 0,76 et 0,81 pour MR-proADM (199, 604), AUC de 0,71 à 0,88 pour MR-proANP (203, 204), AUC de 0,70 à 0,75 pour CT-proAVP (201, 596) et AUC à 0,49 pour CT-proET-1 (199). Une étude statistique plus approfondie de la valeur prédictive de la mortalité, avec analyse multivariée et ajustement sur d'autres paramètres cliniques ou biologiques, a montré que seuls MR-proANP et CT-proAVP apportaient de l'information indépendamment des autres paramètres inclus (204, 596). De même, avec un modèle statistique similaire, nous avons observé que MR-proANP, CT-proAVP ainsi que MR-proADM apportaient de l'information prédictive de la mortalité, en fonction du temps considéré (**articles** 1 et 2). Ainsi, nos résultats sont cohérents avec ceux précédemment décrits et apportent un éclairage additionnel sur les patients en choc septique.

Dans notre étude, l'association sous forme de paires de deux précurseurs d'hormones à action vasoconstrictrice et vasodilatatrice apportait plus d'informations prédictives de la mortalité que lorsqu'ils étaient considérés séparément (pour MR-proADM : OR à 2,16 [IC95% 0,6-7,74], p=0,237 ; pour CT-proAVP : OR à 2,46 [IC95% 0,70-8,71], p=0,162 ; versus pour MR-proADM & CT-proAVP : OR à 5,50 [IC95% 1,23-24,68], p=0,026) (**article 1**). Dans une population de patients septiques, l'association de MR-proADM et CT-proET-1 sous la forme d'un ratio avait permis d'améliorer la valeur prédictive de la mortalité : AUC (MR-proADM) à 0,76 versus 0,81 pour le ratio CT-proET-1/MR-proADM dans le sous-groupe des patients les plus graves. Cependant, l'amélioration observée n'avait pas été évaluée statistiquement (199). Il est à noter que dans des cohortes de patients en post-infarctus du myocarde, l'information pronostique (en termes de mortalité ou de développement d'insuffisance cardiaque) a été améliorée par l'association en paires de deux pro-hormones (605-608). Collectivement, ces résultats indiquent que l'association de plusieurs biomarqueurs pourrait apporter plus d'informations. Cet aspect sera à prendre en compte dans les études futures.

Par ailleurs, nos résultats montrent que la valeur prédictive de la mortalité de MR-proADM et MR-proANP s'améliore au cours du monitoring. Au temps précoce, les AUC respectives pour ces deux pro-hormones sont de 0,710 et 0,678 alors qu'après une semaine, ces valeurs sont de 0,861 et 0,782 respectivement (**articles 1 et 2**). Dans le modèle de régression logistique, quand chacune des pro-hormones est considérée seule dans le modèle, les OR sont aussi améliorés : pour MR-proADM (OR_{J1-2} à 2,16 [IC95% 0,60-7,74], p=0,237 versus OR_{J5-7} à 15,35 [IC95% 3,16-74,57], p=0,001) (**article 1**) et pour MR-proANP (OR_{J1-2} à 2,00 [IC95% 0,65-6,13], p=0,227 versus OR_{J5-7} à 8,35 [IC95% 2,33-29,95], p=0,001) (**article 2**). Dans une moindre mesure, une amélioration de l'information prédictive a également été observée pour MR-proANP dans une cohorte hétérogène de patients septiques entre le temps J0 et J4 après l'inclusion (204). Dans une analyse par régression logistique en multivarié, les résultats pour MR-proANP ont été les suivants : OR_{J0} à 2,35 [IC95% 1,05-5,26], p=0,04 vs OR_{J4} à 3,76 [IC95% 1,39-10,18], p=0,01 (204). La persistance dans le temps de concentrations élevées de pro-hormones vasodilatatrices chez les patients non-survivants pourrait traduire le maintien de dysfonctions cardio-vasculaires, et peut-être permettre l'identification de patients ne répondant pas aux thérapeutiques habituelles. Concernant l'ADM, les fortes concentrations observées pourraient traduire un défaut de réponse de l'endothélium à l'ADM et éventuellement une production accrue de l'hormone par mécanisme compensateur. En effet, l'ADM a comme fonction protectrice de stabiliser la barrière endothéliale (en stabilisant les jonctions protéiques) (609). A la phase précoce du sepsis, l'ADM jouerait un rôle important

dans l'initiation de la réponse hyperdynamique (174). Cependant, il a été montré chez l'animal que la transition tardive vers la phase hypodynamique se mettait en place malgré de fortes concentrations d'ADM circulante. Un défaut de réponse vasculaire à l'effet protecteur de l'ADM pourrait expliquer ce paradoxe (174).

Des éléments importants dans l'utilisation d'un biomarqueur sont la faisabilité et la fiabilité de sa mesure. La quantification des pro-hormones que nous avons étudiées semble compatible avec la prise en charge en routine des patients septiques. En effet, le dosage des trois pro-hormones CT-proAVP, MR-proADM et MR-proANP est disponible sur l'automate BRAHMS Kryptor[®] avec un résultat rendu dans un délai de 30 minutes environ (<http://www.kryptor.net>). Disponible en pratique courante, l'information sur la sévérité de l'atteinte du patient pourrait être utile pour sélectionner les patients les plus graves et leur administrer des traitements ayant un ratio bénéfice/risque non acceptable pour des patients moins sévères. C'est le cas de la protéine C activée Xigris[®] qui peut induire un risque accru de saignements et qui n'est administrée qu'aux patients les plus sévères (score APACHE II >25) (493). Des seuils de concentration de ces pro-hormones pourraient également être utilisés comme nouveaux objectifs thérapeutiques à atteindre lors de la prise en charge initiale du patient (ex. : remplissage vasculaire agressif) à la place de paramètres cliniques pouvant être influencés par les traitements (ex. : augmentation artificielle de la pression artérielle après remplissage vasculaire malgré la persistance de la dysfonction cardio-vasculaire). Cependant, une des étapes préliminaires à une telle utilisation serait de caractériser l'association potentielle entre la physiopathologie cardio-vasculaire du choc septique et les concentrations en pro-hormones d'intérêt. Cela nécessiterait de mener des études dédiées, incluant de manière prospective des données sur l'évolution des paramètres cardio-vasculaires, de la fonction rénale et des concentrations en pro-hormones. En effet, rappelons qu'une des limites de notre étude est que la cohorte de patients était initialement conçue pour un monitoring de paramètres immunitaires. Enfin, dans le processus de développement de biomarqueurs, après détermination et validation clinique de seuils de concentration adéquats, les études d'impact permettraient d'évaluer le réel apport de ces biomarqueurs dans la pratique courante.

1.2. Immunodépression acquise en réanimation

1.2.1. Altérations des monocytes et des cellules dendritiques

Au cours de la phase de dépression immunitaire induite par les états septiques, les monocytes des patients présentent différentes altérations phénotypiques et fonctionnelles telles que la perte de leur capacité à engendrer une réponse pro-inflammatoire en réponse à une seconde

stimulation bactérienne (phénomène de tolérance à l'endotoxine), une capacité réduite de recrutement sur le site infectieux, de phagocytose et de destruction des microorganismes ou de présentation de l'antigène (237), ainsi qu'une augmentation de leur expression des molécules co-inhibitrices comme celles du système PD-1:PD-L (**article 4**). Le biomarqueur qui a été le plus étudié jusqu'à maintenant pour évaluer l'état d'immunodépression des monocytes est l'expression des molécules HLA-DR à leur surface. Cette expression permet de prédire le risque de mortalité des patients septiques (308, 309, 610) et plus récemment, il a été observé que la persistance d'une baisse d'expression de HLA-DRm était prédictive du risque d'infections nosocomiales chez les patients en choc septique (307) ou admis en réanimation (290). Dans l'**article 5** de ce travail, il est montré que cette baisse d'expression de HLA-DRm est aussi prédictive du risque de développer une infection secondaire dans une cohorte exclusivement constituée de 105 patients polytraumatisés. La baisse d'expression de HLA-DRm (par rapport aux valeurs mesurées chez des sujets sains) rapidement après le traumatisme, a déjà été documentée dans d'autres études (611, 612). Dans plusieurs cohortes de traumatisés, il a aussi été décrit que les patients qui développent un épisode septique après leur traumatisme sont ceux qui ne restaurent pas (pendant le temps de suivi) ou que tardivement leur expression de HLA-DRm par rapport aux patients sans infection (613-617). Dans la majorité de ces études, chez les patients ne développant pas d'infection, les valeurs de HLA-DRm se normalisaient environ 7 jours après le traumatisme (613-617), alors que chez les patients développant une infection, cette restauration était observée au bout d'un mois de suivi (613). Cependant une limite de ces études qui complique l'interprétation des résultats, est l'absence d'utilisation de méthodes standardisées inter-laboratoires pour le dosage de HLA-DRm par cytométrie en flux (618). Par exemple, seule l'équipe de Huschak *et al.* a utilisé des billes de calibration QuantiBrite[®] qui permettent de rendre un résultat (en nombre d'anticorps par cellule) qui soit interprétable d'un laboratoire à l'autre (619). Ainsi, à notre connaissance, notre étude est la première à évaluer la valeur prédictive de l'expression de HLA-DRm pour la survenue d'infections secondaires chez les polytraumatisés en utilisant les méthodes recommandées pour la mesure de HLA-DRm (par cytométrie en flux (619)) et une analyse statistique multivariée tenant compte de facteurs confondants. Sur la base de ces résultats encourageants qui devront être confirmés dans des cohortes de patients plus importantes, la mesure de l'expression de HLA-DRm pourrait être adoptée pour guider une prise en charge préventive des infections nosocomiales chez les polytraumatisés (ex. : antibiothérapie préventive ou traitement immunostimulant).

Le rôle des cellules dendritiques dans la physiopathologie septique est de plus en plus documenté. Hotchkiss *et al.* ont tout d'abord observé dans une étude post-mortem que les patients septiques présentaient une diminution du nombre de cellules dendritiques spléniques par rapport à des traumatisés (263). Des études récentes ont conforté ces résultats en montrant une déplétion en cellules dendritiques au niveau du sang périphérique chez des patients en choc septique (262, 620) ainsi qu'un pourcentage de cellules dendritiques apoptotiques plus important par rapport aux sujets sains (621). Par ailleurs, au cours du sepsis, ces cellules présenteraient des altérations fonctionnelles avec une capacité moindre à produire des cytokines pro-inflammatoires ou à induire une prolifération lymphocytaire (541, 542). Au niveau clinique, il a été montré que la perte des cellules dendritiques était plus marquée chez les patients qui décédaient (par rapport aux survivants) (262) ou que la persistance de la déplétion des cellules dendritiques de type myéloïde (7 jours après le choc) était associée à un risque accru de développer des infections nosocomiales (620). L'importance des cellules dendritiques dans la réponse immune a encore été confirmée récemment dans deux études conduites chez l'animal qui ont décrit que la survie accrue des cellules dendritiques (induite par une sur-expression spécifique de BCL-2 dans ces cellules) (622) ou que la restauration de leur fonctionnalité (par l'administration de molécules ayant un effet immunostimulateur sur les cellules dendritiques) (623) permettaient d'améliorer la survie des souris dans un modèle de choc septique ou de pneumonie induite après un choc hémorragique. Les cellules dendritiques constituent donc une cible thérapeutique potentiellement intéressante lors des états septiques.

1.2.2. Altérations lymphocytaires

Le versant lymphocytaire du système immunitaire présente également des altérations induites par les états septiques. L'importance de ces dysfonctions a été soulignée dans plusieurs études récentes montrant la fréquence importante des maladies infectieuses opportunistes chez les patients septiques. Par exemple, près d'un tiers des patients de réanimation avec un sepsis sévère présente une réactivation du *Cytomegalovirus*, ce qui aurait des conséquences néfastes en termes de morbidité et mortalité (624-626). Dans l'étude de Heininger *et al.*, les patients inclus dans l'étude étaient initialement immunocompétents (626), cependant suite à leur sepsis sévère, ils ont développé un état d'immunosuppression permettant la réactivation virale. Des résultats similaires ont été rapportés avec des réactivations virales à *Herpes simplex virus* (441, 443). Compte tenu de l'implication des lymphocytes dans la production de cytokines pro-inflammatoires ou dans l'activation des macrophages et de leurs propriétés

cytotoxiques, leur perte au cours du sepsis pourrait jouer un rôle dans cette réactivation virale (438).

D'une manière plus générale, ces dysfonctions lymphocytaires semblent également associées au développement d'infections nosocomiales et à un mauvais pronostic des patients septiques ou traumatisés. Tout comme les réactivations virales, la fréquence des infections nosocomiales est importante chez les patients septiques et se manifesterait plus particulièrement à la phase tardive du sepsis. En effet dans l'étude de Otto *et al.* il a été montré que la fréquence des infections à bactéries considérées comme opportunistes était plus importante au-delà de 16 jours après le choc par rapport à la phase très précoce (correspondant aux cinq premiers jours après le choc). De même la fréquence des infections à *Candida spp* était de plus de 30 % au cours de la période de temps comprise entre le sixième jour après le choc et la fin de la période d'observation à 150 jours (627).

Une étude réalisée dans une population d'enfants admis en réanimation a montré qu'une lymphopénie transitoire (durant 3 à 7 jours) était associée à un risque accru de développer des infections nosocomiales (OR = 4,4, IC95% 1,2-15,4 ; $p < 0,02$). Ce risque était encore plus important en cas de lymphopénie prolongée (OR = 5,5, IC95% 1,7-17 ; $p < 0,05$) et était aussi associé à un risque augmenté de mortalité (OR = 6,8, IC95% 1,3-34 ; $p < 0,05$) (321). Des résultats similaires ont été rapportés dans une cohorte d'adultes en choc septique où les patients non-survivants étaient ceux qui ne restauraient pas leur nombre de lymphocytes circulants six jours après le début du choc (317). Récemment, Monserrat *et al.* ont montré que la lymphopénie semble persister au cours des premières semaines après l'admission des patients en service de réanimation et touche à la fois les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (315). En plus de l'anomalie de nombre, la fonctionnalité des lymphocytes semble aussi altérée. Chez des patients adultes septiques ou traumatisés, des tests d'hypersensibilité retardée à cinq antigènes de rappel différents (dont candidine ou tuberculine) permettant d'évaluer *in vivo* la fonctionnalité de l'immunité cellulaire, ont montré une association entre anergie cellulaire et mortalité. La fréquence de décès était de 100 % (9/9 patients) pour les patients totalement anergiques (pas de réponse à aucun des 5 antigènes), 28 % chez les patients avec une anergie relative (réponse à un des 5 tests cutanés) contre 7 % (2/28 patients) chez les patients avec une réponse normale aux 5 tests (628). Sur le même principe, mais avec des tests cutanés réalisés à deux temps successifs, les patients avec une réponse réduite aux antigènes de rappel aux deux temps avaient une mortalité de 74 % contre 2,1 % chez les patients avec une réponse normale ou réduite puis normalisée (629).

Un des mécanismes pouvant expliquer la baisse ou la perte de fonctionnalité lymphocytaire est l'implication des systèmes de co-récepteurs activateurs et inhibiteurs. La baisse d'expression des molécules CD3 à la surface des lymphocytes T ou au niveau ARNm a été décrite dans plusieurs études : chez l'animal dans un modèle murin de CLP (344) et chez l'homme chez des patients en sepsis sévère (350), des patients septiques après une chirurgie invasive (351) ou des traumatisés (352). L'expression du CD28, autre molécule co-activatrice importante, serait aussi diminuée (352). En parallèle, une augmentation des molécules co-inhibitrices est présente. Dans l'**article 4** nous avons observé une augmentation de l'expression des molécules du système PD-1 à la surface des lymphocytes (PD-1 et PDL-1) et des monocytes (PD-1, PD-L1 et PD-L2) de patients en choc septique. Des études récentes ont confirmé ces résultats en montrant une expression de PD-1 augmentée sur les lymphocytes T (630) et les monocytes (425) de patients en choc septique, ainsi qu'une expression de PD-L1 plus élevée sur les monocytes de ces patients par rapport à des sujets sains (630). Dans l'**article 4**, cette augmentation de l'expression des molécules du système PD-1 était associée à une dysfonction des cellules immunitaires. En effet, nous avons observé une corrélation inverse entre l'augmentation de l'expression de PD-1 ou de PD-L1 sur les lymphocytes CD4⁺ et la baisse des capacités prolifératives lymphocytaires en réponse à un mitogène (PHA). Des résultats similaires ont été observés dans d'autres pathologies infectieuses telles que l'hépatite B ou l'infection à VIH (404, 410). De plus, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre l'expression des molécules du système PD-1 monocyttaire et les concentrations plasmatiques en IL-10. Il est à noter que cette augmentation de la concentration en IL-10 pourrait participer à la baisse de la prolifération lymphocytaire comme cela a été observé dans une étude chez des patients infectés par le virus VIH (414). Dans la lignée de nos résultats, une étude récente de Zhang *et al.* a montré que *in vitro* le blocage des molécules PD-L1 permettait de réduire la production d'IL-10 et d'augmenter celle du TNF- α et de l'IL-6 (630). Cette équipe a confirmé chez l'homme les résultats qu'elle avait précédemment observés dans un modèle murin de CLP (423). Un autre versant sur lequel interviendrait le système PD-1 lors du choc septique et que nous n'avons pas étudié est l'apoptose. En effet, *in vitro* chez les patients en choc septique et *in vivo* chez les souris après CLP, les anticorps bloquants ce système induisent une baisse de l'apoptose lymphocytaire (423, 424, 630). Dans notre étude, nous avons observé que les patients qui développent une infection nosocomiale expriment davantage PD-1 et PD-L2 au niveau monocyttaire par rapport aux patients sans infection secondaire (**article 4**). Ces résultats sont en cohérence avec ceux observés chez la souris septique. En effet, deux équipes différentes ont montré que les souris KO pour PD-1 ou les souris sauvages traitées avec des anticorps bloquant la liaison entre PD-1 et PD-L1 avaient

une clairance bactérienne améliorée (423, 425). Enfin le blocage du système PD-1 (ou sa répression chez les souris KO pour PD-1) se traduit aussi par une amélioration de la survie des souris septiques (423-425). Chez les patients en choc septique, une augmentation de l'expression de PD-L1 monocytaire est associée à une mortalité plus importante (**article 4**). Ces résultats suggèrent que l'expression des molécules du système PD-1 pourrait être utilisée comme marqueur des dysfonctions immunitaires ou comme biomarqueur du risque d'infections nosocomiales ou de mortalité. Ceci serait néanmoins à confirmer sur une large cohorte de patients.

D'autres systèmes co-inhibiteurs seraient impliqués dans la physiopathologie septique ou post-traumatique. Ainsi l'expression du CTLA-4 (ou CD152) est augmentée sur les lymphocytes de patients en choc septique et serait corrélée à l'apoptose lymphocytaire (631). Une analyse par transcriptomique a montré que les polytraumatisés avaient une expression ARNm augmentée pour les co-récepteurs CTLA-4, *Signal regulatory protein alpha* (SIRPalpha)-CD47 et LAG-3 par rapport à des sujets sains. Certaines molécules intervenant dans la signalisation négative de ces co-récepteurs avaient également une expression ARNm augmentée, comme SHP-1 ou l'ubiquitine ligase c-Cbl (355). Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique avec une expression en CD47 et en CTLA-4 augmentée sur les lymphocytes T anergisés des traumatisés par rapport aux patients ayant des lymphocytes immunocompétents (354). Une étude récente menée chez la souris a montré qu'il y avait une augmentation de l'expression lymphocytaire de CTLA-4 au cours du sepsis induit par CLP. De plus, l'administration d'anticorps bloquant anti-CTLA-4 (après la CLP) a permis de réduire l'apoptose lymphocytaire et d'améliorer la survie des souris septiques traitées (632). Ainsi, notre compréhension de l'implication des systèmes de co-signalisation dans la physiopathologie septique semble être un élément important dans la physiopathologie septique. Cependant, la complexité de la mise en jeu des nombreux systèmes co-inhibiteurs dans les mécanismes immunosuppresseurs septiques ou post-traumatiques nécessitent des études approfondies.

En plus des anomalies de fonction des lymphocytes, une altération de leur nombre est aussi décrite. Dans l'**article 6**, nous avons observé que dès le début du choc septique, les patients présentent une baisse du nombre de leurs lymphocytes CD8⁺, CD4⁺, et au sein des CD4⁺, une baisse des lymphocytes Th1, Th2, Treg et Th17 (évaluée par la mesure de l'ARNm de leur facteur de transcription respectif T-bet, GATA-3, FOXP3 et RORγ). Ces résultats sont en accord avec nos résultats précédents mesurant l'expression des ARNm de T-bet, GATA-3 et FOXP3 à J1-2 après le début du choc (331, 633). Cependant, chez ces mêmes patients,

l'expression ARNm de FOXP3 était rapidement restaurée entre J3 et J6 après le choc (330, 331), suggérant que les fonctions régulatrices des lymphocytes seraient donc maintenues au cours du sepsis (237, 343, 634). Plusieurs études menées chez l'homme ou chez l'animal ont montré qu'une augmentation du pourcentage des Treg était une des caractéristiques de l'altération des sous-populations lymphocytaires présente après un sepsis ou un traumatisme (332-335). Dans une étude récente, Nascimento *et al.* ont montré l'implication des Treg dans l'immunosuppression présente lors du choc septique. En effet, chez les souris rendues septiques après CLP, ils ont observé que les fonctions immunosuppressives des Treg intervenaient dans la susceptibilité des animaux à décéder suite à une seconde infection par *Legionella pneumophila* (à laquelle les souris sont naturellement résistantes) (336). Le blocage de ces fonctions par des anticorps anti-GITR permettait d'améliorer *in vitro* la prolifération des lymphocytes T effecteurs, et *in vivo* de réduire la prolifération bactérienne de *L. pneumophila* et d'améliorer la survie des souris à l'infection secondaire (336). Cavassani *et al.* ont mis en évidence chez la souris septique une augmentation des capacités immunosuppressives des Treg à J3 et J15 après la CLP par rapport à J1 (avec une inhibition plus importante par les Treg de la prolifération des lymphocytes T après stimulation *in vitro* ou de la production d'IFN- γ) (340). Les Treg semblent participer à la persistance de l'état d'immunodépression jusqu'à plusieurs semaines après le choc septique. En effet dans un modèle d'implantation de tumeurs chez la souris 15 jours après une CLP, le pourcentage de Treg était plus important dans les ganglions drainant la tumeur (par rapport aux souris n'ayant pas subi de CLP) et participait à l'inhibition des fonctions anti-tumorales des lymphocytes CD8⁺, se traduisant au final par une expansion tumorale plus importante (340).

Un des mécanismes pouvant expliquer la baisse du nombre de lymphocytes circulants est l'augmentation des mécanismes apoptotiques dans ces cellules. Chez des patients en choc septique, nous avons observé une augmentation de l'expression ARNm des facteurs pro-apoptotiques BID et FAS et une diminution de celle de BCL-2 anti-apoptotique par rapport à des sujets sains (**article 7**). D'autres études ont montré une augmentation de l'expression des facteurs BID, BIM, PUMA, FAS ou une diminution de BCL-2 dans les leucocytes de patients ou d'animaux septiques (635-639). La forte diminution de l'expression ARNm de BCL-2 dans les cellules mononucléées circulantes de patients en sepsis sévère serait d'ailleurs corrélée à un mauvais pronostic (638). Au contraire, le ciblage particulier des molécules pro-apoptotiques comme le *knock-down* de BID ou BIM ou l'injection d'ARNm silencieux contre BIM ou PUMA, permet de réduire le nombre de lymphocytes apoptotiques (de la rate ou du thymus) chez les souris septiques et d'améliorer leur survie par rapport aux souris sauvages

(635, 640, 641). Ainsi, les mécanismes responsables de l'apoptose constituent une cible thérapeutique potentiellement intéressante au cours du sepsis. Cependant, comme pour tout traitement immunomodulateur, cette thérapeutique ne pourrait être administrée qu'à des patients préalablement ciblés, par exemple sur la base de marqueurs de l'apoptose. Néanmoins, comme nous l'avons vu dans l'**article 7**, l'évaluation de l'apoptose en clinique implique des conditions analytiques peu compatibles avec une analyse en routine. Les protocoles devront donc être améliorés dans le futur.

Au total, nous avons montré (1) que la sur-expression des molécules PD-1 est associée à l'anergie leucocytaire, (2) que la baisse du nombre de lymphocytes circulants est présente dès le début du choc septique, (3) que la cinétique d'expression de HLA-DRm est plus informative en termes de prédiction du risque d'infections nosocomiales que son expression à un temps donné, et (4) que l'expression ARNm des molécules BID et FAS semble constituer un biomarqueur plutôt robuste de l'apoptose leucocytaire. Ces informations seront à prendre en compte dans l'éventuelle définition d'un panel de biomarqueurs visant à monitorer l'immunodépression.

2. Intérêt des biomarqueurs pour une thérapeutique ciblée et individualisée

2.1. Définitions et généralités sur les biomarqueurs

Il n'y a pas de définition clairement établie de ce qu'est un biomarqueur (ou marqueur biologique). C'est un paramètre qui peut être mesuré de manière objective et qui sert d'indicateur (de normalité ou de pathologie) pour un processus biologique donné, ou pour évaluer une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique (642). Un biomarqueur peut être de différentes natures : ce peut être notamment une molécule soluble ou exprimée au niveau cellulaire, l'expression ARN d'un gène ou une altération génétique (ex. : mutation ou polymorphisme nucléotidique simple) (643). Avec le développement de la génomique, la transcriptomique ou la protéomique, ce sont maintenant des variations d'ensemble de molécules qui peuvent être analysées simultanément et aboutir à des profils ou « signatures » particuliers (643).

Un biomarqueur peut apporter de l'information aux cliniciens à plusieurs niveaux de la prise en charge des patients. Tout d'abord, il peut permettre de détecter une pathologie à un stade très précoce de la maladie et ainsi permettre d'initier la prise en charge du patient avant l'amplification du mécanisme pathologique ou avant la mise en place d'événements très graves voire irréversibles pour l'organisme. Dans la suite de la pathologie, un biomarqueur peut permettre de suivre l'évolution de la maladie. Un biomarqueur peut aussi guider une prise en charge thérapeutique : soit en identifiant les patients les plus à risque de décéder et qui recevront des thérapeutiques plus agressives (la balance bénéfique/risque étant différente de celle de patients avec un bon pronostic vital), soit en identifiant les patients les plus susceptibles de répondre à une thérapeutique donnée. De plus, un biomarqueur peut permettre de suivre la réponse au traitement administré et ainsi faciliter l'adaptation de la prise en charge (**Figure 40**) (643, 644).

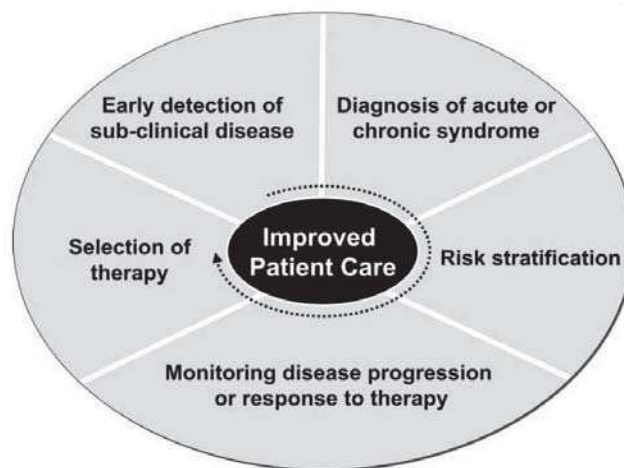


Figure 40 : Applications cliniques des biomarqueurs (644)

Un même biomarqueur peut difficilement apporter de l'information à la fois en termes de diagnostic de la pathologie, de stratification des patients par groupes de risque et d'aide à la thérapeutique, c'est pourquoi l'utilisation de panel de biomarqueurs est de plus en plus envisagée (645).

Pour pouvoir apporter de l'information aux cliniciens, un biomarqueur doit remplir certaines conditions. Trois items généraux principaux se dégagent (**Figure 41**). Pour commencer, le biomarqueur doit pouvoir être dosé « facilement » par le clinicien, ce qui implique que le prélèvement soit le moins invasif possible, que le biomarqueur soit suffisamment stable dans le temps avant d'être dosé, et que la méthode de dosage soit exacte, reproductible, rapide, réalisable à toute heure et avec un coût raisonnable (644). Second élément important, le

biomarqueur doit apporter une information nouvelle qui soit associée fortement à un évènement clinique d'intérêt, et qui soit complémentaire des autres paramètres déjà disponibles pour les cliniciens. Les seuils utilisés pour discriminer les patients doivent être vérifiés et validés dans plusieurs cohortes de patients. Les paramètres physiologiques pouvant influencer sur l'élimination ou l'activité biologique du biomarqueur et fausser l'interprétation du dosage par rapport aux seuils déterminés doivent être identifiés (644).

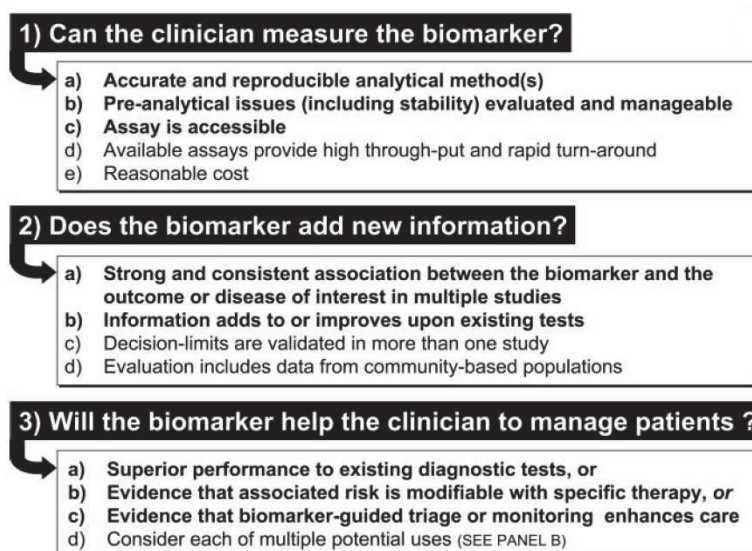


Figure 41 : Conditions requises pour l'utilisation en clinique d'un biomarqueur (644)

Pour finir, le biomarqueur doit permettre d'améliorer la prise en charge des patients (644) : les études d'impact permettent d'évaluer si la prise en compte du biomarqueur testé en plus des paramètres habituellement utilisés (ou reconnus comme technique de référence) améliore ou non un évènement clinique donné comme la survie des patients.

Prenons comme exemple chez les patients de réanimation HLA-DRm. C'est un biomarqueur dont les conditions analytiques de mesure doivent être optimisées (ex. : délai de moins de 4 heures entre le prélèvement sanguin et le marquage cellulaire) et peuvent être standardisées avec l'emploi de billes de calibration pour rendre les résultats reproductibles entre différents sites (619, 646). Une baisse importante d'expression de HLA-DRm est associée à un dysfonctionnement monocytaire qui n'est actuellement pas renseigné par d'autres biomarqueurs en pratique courante (237). La mise en place d'études d'impact constitue une étape finale nécessaire à son utilisation en clinique (647).

2.2. Intérêts des biomarqueurs dans la prise en charge du sepsis

2.2.1. Diagnostic de l'état septique

La prise en charge du sepsis doit être instaurée rapidement : en effet dans les 6 premières heures après le début du choc septique, la mise en place d'une antibiothérapie et d'une thérapeutique hémodynamique avec des objectifs définis favorise la survie des patients septiques (457, 465). Cependant l'identification de l'état septique reste difficile et retarde l'initiation de la thérapeutique, en particuliers chez les patients de réanimation qui ont pour la plupart un SIRS et présentent donc des caractéristiques cliniques proches du sepsis. Dans une étude clinique menée sur 3 708 patients de réanimation, 68 % d'entre eux présentaient un SIRS (défini par au moins 2 critères) (648). Les patients se présentant dans les services d'urgence constituent une autre population de malades très hétérogène pour qui le diagnostic de sepsis peut être difficile et l'aggravation de la pathologie peut être très rapide. Une étude incluant rétrospectivement 379 patients septiques non compliqués a montré que 22,7 % d'entre eux ont développé dans les 72 heures suivant leur admission un sepsis sévère ou un choc septique. La mortalité à 30 jours était 4 fois plus élevée chez les patients avec une progression rapide de la maladie par rapport à ceux sans aggravation (8 % et 2 % de mortalité respectivement) (649).

Ces éléments justifient donc la recherche de techniques identifiant rapidement les microorganismes (ex. : techniques de biologie moléculaire) ou la recherche de biomarqueurs qui permettraient de différencier rapidement les patients ayant un SIRS associé ou non à une infection.

La PCT et la CRP sont deux biomarqueurs qui ont été beaucoup étudiés dans cette indication de diagnostic d'infection et que nous avons détaillés précédemment. Cependant la CRP n'est pas spécifique de l'infection (65) et la PCT, bien que présentant des performances supérieures, n'est pas considérée comme un bon outil diagnostique (71) et est finalement plus étudiée dans l'indication de suivi de l'efficacité de l'antibiothérapie (65, 650). Plus récemment, sTREM-1 a donné des résultats encourageants qui restent cependant à confirmer (74). De nombreuses autres molécules sériques ont aussi été évaluées comme *soluble urokinase plasminogen activator receptor* (suPAR) dont les concentrations sont augmentées chez les patients septiques par rapport à ceux présentant un SIRS (651, 652). Néanmoins sa valeur prédictive du sepsis semble peu intéressante (ex. : AUC à 0,615 dans une étude incluant 273 patients de réanimation) (652, 653) et suPAR est plus étudié actuellement pour sa valeur prédictive de la mortalité dans l'atteinte septique (654, 655).

Ainsi, étant donné les difficultés à obtenir un biomarqueur circulant ayant une valeur diagnostique intéressante, d'autres approches ont été développées telles que la recherche de biomarqueurs par cytométrie en flux. La mesure de l'expression du CD64 à la surface des PNN est une approche qui semble prometteuse. Le CD64 correspond à un récepteur de haute affinité pour la partie Fc des immunoglobulines G (FcγRI). Il est exprimé à un niveau très faible sur les PNN au repos et son expression est induite sur les PNN activés après exposition à du LPS ou en présence d'IL-12, d'IFN-γ ou de G-CSF (656, 657). L'expression du CD64 sur les PNN est plus élevée chez les patients septiques par rapport aux sujets sains ou aux patients non infectés (76, 658) et augmenterait même avec la sévérité du sepsis (659). Plusieurs études ont évalué l'intérêt de l'expression du CD64 pour diagnostiquer une infection. Dans une cohorte de 109 patients adultes hospitalisés, l'AUC du CD64 pour différencier les patients non infectés des patients infectés (avec culture bactérienne positive ou forte suspicion d'infection d'après les symptômes cliniques) était de 0,943 (IC95% 0,919-0,967 ; $p < 0,001$), ce qui était bien supérieur à l'AUC obtenue pour le nombre de leucocytes à 0,626 (IC95% 0,572-0,680 ; $p = 0,022$) (77). Chez les enfants de plus de un mois, l'expression du CD64 sur les PNN est un outil diagnostique très intéressant avec une sensibilité à 71 %, une spécificité à 100 %, une valeur prédictive positive à 100 % et une valeur prédictive négative à 96 %. Dans cette étude, les performances du CD64 étaient supérieures à celles de la PCT ou de la CRP (660). Dans une méta-analyse récente incluant 13 études avec des populations de patients adultes et enfants (1 921 patients au total), les auteurs ont obtenu une AUC globale de 0,94 pour le diagnostic d'infection bactérienne par l'expression en CD64 des PNN (661). Une étude très récente incluant 631 patients admis aux urgences a donné des performances bien plus faibles pour le CD64. Cependant par rapport aux autres études menées chez l'adulte, la population de patients était jeune (âge médian 51 ans), hétérogène, avec peu de co-morbidités, une faible sévérité de l'atteinte, et la durée moyenne de présentation aux urgences après les premiers symptômes était de 72 heures. Or l'augmentation de l'expression du CD64 est précoce après l'infection, ainsi le pic d'expression était peut-être dépassé chez la majorité des patients inclus (662). Au final, mis à part cette dernière étude, les résultats sur la valeur diagnostique du CD64 sont très encourageants. De plus, au niveau analytique, la mesure de l'expression du CD64 est compatible avec une activité de routine : l'expression semble stable jusqu'à 30 heures après le prélèvement à température ambiante. De plus, un kit est disponible et permet une mesure rapide du CD64 (45 minutes) sans nécessiter d'expertise majeure en cytométrie en flux (77, 660). A terme, cette mesure pourrait être réalisée par les automates utilisés dans les laboratoires d'hématologie, ce qui simplifierait encore son dosage (663).

Deux autres approches actuellement en plein essor sont l'étude de l'expression des gènes et des protéines. Par rapport au génome complet, seule une part mineure de la séquence ADN est transcrite en ARNm (correspondant au transcriptome) puis traduite en protéines (correspondant au protéome) (41). L'étude du transcriptome (ou transcriptomique) par la technique des *microarrays* permet de mesurer rapidement l'expression de centaines de gènes en une seule analyse (664). Brièvement l'ARNm des cellules est isolé, puis étant fragile, il est converti en ADN complémentaire et marqué avec une sonde fluorescente. Cet ADN est ensuite hybridé avec des séquences ADN simple brin fixées sur une puce puis révélées après excitation des sondes avec un laser (664). Par cette technique, des voies entières de signalisation sont analysées et de nouveaux gènes impliqués dans la physiopathologie septique peuvent ainsi être découverts (664).

En 2007 a été menée une des premières études ayant pour but d'identifier un profil de gènes qui permettrait de différencier parmi 44 patients de réanimation, ceux septiques de ceux présentant un SIRS stérile (665). L'analyse était restreinte aux PNN et l'expression de 18 664 gènes a été évaluée par la technique des *microarrays*. Après analyse, l'expression de 50 gènes a été retenue et permettait de distinguer les SIRS infectés des SIRS stériles avec une précision (définie comme la somme des vrais positifs et des vrais négatifs divisés par le nombre total de patients) de 91 %. Le profil de gènes sélectionnés a ensuite été testé dans une cohorte de 50 autres patients, et les performances diagnostiques ont été confirmées avec une précision de 88 % (665). La même équipe s'est ensuite intéressée au profil génique des cellules mononucléées du sang périphérique et ont retenu une signature de 138 gènes (sur 54 675 gènes analysés) permettant de discriminer les patients de réanimation septiques de ceux ayant un SIRS avec une précision de 91 % (cohorte de 35 patients au total). Dans une cohorte de validation de 35 patients, la précision du panel de gènes était de 80 %. Les gènes retenus intervenaient principalement dans les mécanismes immuno-inflammatoires et apoptotiques (666). Ces résultats sont très encourageants pour l'amélioration du diagnostic du sepsis et ainsi la prise en charge des patients. Cependant, une des limites de ces études est le faible nombre de patients inclus par rapport au nombre considérable de gènes analysés. Des cohortes plus importantes de patients devront être envisagées pour les études de ce type à venir.

Concernant l'étude du protéome (ou protéomique), elle a l'avantage par rapport à la transcriptomique d'étudier le « produit fini » fonctionnel de l'expression d'un gène. Les protéines ont un rôle fondamental en physiologie et physiopathologie puisqu'elles

comprennent les enzymes, les récepteurs, les canaux ioniques etc. et permettent aux systèmes biologiques de fonctionner (667). La protéomique pourrait être utilisée dans le diagnostic de l'état infectieux pour trouver des biomarqueurs ou des panels protéiques permettant de différencier les patients infectés des autres. Un intérêt particulier est porté sur le protéome des cellules endothéliales (cellules centrales dans la physiopathologie septique) et sur le protéome des plaquettes, étant donné la fréquence des troubles de la coagulation et des thrombocytopathies lors du sepsis (667). Cependant un frein au développement de la protéomique est son niveau de complexité par rapport à la transcriptomique. En effet, la synthèse d'une protéine fonctionnelle dépend de nombreux facteurs comme des modifications post-transcriptionnelles influant par exemple sur la stabilité des ARNm, ou des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation des protéines, leur oxydation etc. qui dépendent de l'état d'activation de la cellule (668). Près de 1 000 000 variants protéiques constitueraient le protéome, avec une expression protéique distincte en fonction des cellules, des organelles ou des fluides biologiques (669). A cela s'ajoute une difficulté technique : la détection de faibles concentrations de protéines dans un lysat cellulaire reste difficile. De plus, le séquençage de peptides prend beaucoup de temps et est plus coûteux que le séquençage de l'ADN. L'automatisation et la standardisation des techniques de protéomique sont encore problématiques (668, 670).

2.2.2. Contrôle de l'efficacité de l'antibiothérapie

Chez les patients septiques, l'antibiothérapie est un des piliers de la prise en charge des patients : lorsque les antibiotiques adéquats ne sont pas administrés précocement, la survie du patient se réduit d'heure en heure (457). Cependant l'excès inverse, avec mise sous traitement et prolongement non justifié de l'antibiothérapie, est à éviter. En effet, ces traitements supplémentaires peuvent induire des effets indésirables et représentent un certain coût. De plus, étant donné l'augmentation de la fréquence des résistances bactériennes aux antibiotiques, un usage plus limité des antibiotiques est recommandé pour réduire la prévalence de ces résistances bactériennes (671). La PCT est le biomarqueur qui a été le plus étudié dans cette indication. Deux revues récentes regroupant neuf études incluant au total près de 4000 patients ont montré que la PCT permettait de raccourcir la durée de l'antibiothérapie de manière significative sans aggraver les événements cliniques tels que la mortalité ou le séjour en réanimation, et pouvait même raccourcir la durée d'hospitalisation (650, 672). Le bénéfice apporté par la PCT était présent dans différentes cohortes de patients : ceux atteints de pneumopathie induite par ventilation mécanique, de broncho-pneumopathie chronique obstructive, de pneumonie communautaire, de sepsis sévère ou de choc septique

(672). Cependant, très récemment, des résultats différents ont été publiés suite à un essai clinique contrôlé et randomisé incluant 1 200 patients de réanimation : *The Procalcitonin and Survival Study* (PASS, NCT00271752). Dans le groupe contrôle (596 patients), l'antibiothérapie était guidée par les recommandations cliniques actuelles, alors que dans l'autre groupe (604 patients), le traitement antibiotique était guidé en plus par le dosage quotidien de la PCT. Une « alerte PCT » (correspondant à une concentration supérieure à 1 ng/ml et une absence de diminution d'au moins 10 % par rapport à la valeur précédente) devait conduire à une prise en charge renforcée de l'infection avec un élargissement du spectre antibiotique et une recherche intensifiée de foyers infectieux (par examens bactériologiques et radiologiques). En l'absence d'alerte, la prise en charge était conforme aux recommandations avec possibilité de réduire l'antibiothérapie si la concentration en PCT était $< 1,0$ ng/ml pendant au moins 3 jours successifs. Les résultats de l'étude ont montré que l'adaptation de l'antibiothérapie basée sur le dosage de la PCT a entraîné une augmentation de la durée du traitement antibiotique et n'avait pas d'effet sur la mortalité (673). Plusieurs éléments pourraient expliquer ces résultats différents des études précédentes : le seuil décisionnel choisi qui a pu réduire la fréquence des interventions potentielles (673) et la proportion importante de patients en post-chirurgie (près de 40 % dans chaque bras), ce facteur pouvant provoquer une augmentation des concentrations en PCT (65).

D'autres études avec un recrutement plus important de patients sont actuellement en cours (accessibles sur le site clinicaltrials.gov) : *Procalcitonin to Shorten Antibiotics Duration in ICU Patients* (ProShort, NCT01379547, recrutement estimé : 1 700 patients) et *Safety and Efficacy of Procalcitonin Guided Antibiotic Therapy in Adult Intensive Care Units* (SAPS, NCT01139489, recrutement estimé : 2 246 patients). Elles devraient permettre de confirmer ou d'infirmer les premiers résultats encourageants qui avaient été obtenus pour la PCT sur des plus petites cohortes de patients.

2.2.3. Stratification des patients par groupe de sévérité et défaillance d'organe

Comme vu précédemment, les patients septiques constituent une population très hétérogène qui nécessite une prise en charge différente d'un patient à l'autre. Une première étape dans la personnalisation des soins serait de pouvoir stratifier rapidement les patients par groupes de sévérité, afin d'être capable de prendre des décisions thérapeutiques très tôt dans leur prise en charge, comme l'administration ou non de traitements agressifs ou coûteux.

Plusieurs scores cliniques ont été développés chez les patients septiques tels que le score de défaillance d'organe SOFA (586) ou les scores de sévérité SAPS II (585) et APACHE II (674). Initialement ces scores ont été développés pour améliorer la recherche clinique : en

effet, la constitution de groupes de patients facilite les analyses épidémiologiques et permet de comparer les résultats obtenus d'une étude à l'autre pour un niveau de sévérité donné (585, 586, 675). Cependant une limite majeure de leur utilisation est que le calcul de ces scores est fait rétrospectivement et non en temps réel en pratique courante, car il nécessite un recueil de données cliniques sur 24 heures. Ils ne sont donc pas informatifs dans les toutes premières heures du choc qui sont pourtant déterminantes. En effet, le statut des patients septiques admis aux urgences peut se dégrader très rapidement et avoir des conséquences sur la mortalité des patients (649). De manière similaire, dans une cohorte de 1 036 patients en sepsis sévère, l'évolution du score SOFA (calculée rétrospectivement) montrait que les patients dont l'état clinique se dégradait dans les 24 premières heures de la prise en charge avait une mortalité à 28 jours de 46 % contre 22 % chez les patients dont la clinique s'améliorait (584). L'information précoce sur la physiopathologie septique est donc majeure et doit être évaluée. Une alternative aux scores cliniques pourrait être l'utilisation de biomarqueurs dont les résultats seraient disponibles beaucoup plus tôt dans la prise en charge des patients. Cette notion de précocité des données a été mise en avant en 1997 dans une étude de Fine *et al.* qui avait pour but de valider un score permettant d'identifier rapidement les patients ayant une pneumonie communautaire avec un bon pronostic vital, de manière à éviter leur hospitalisation inutile. Les variables incluses dans le modèle étaient des paramètres disponibles dès l'admission des patients aux urgences : des données cliniques (ex. : âge, sexe, certaines co-morbidités), des paramètres physiologiques (ex. : pression artérielle, fréquence cardiaque) et des biomarqueurs facilement mesurables en routine (ex. : urémie, glycémie) (676). Dans le cadre du sepsis, il serait au contraire plus intéressant d'identifier les patients dont l'état clinique risque de se dégrader, de façon à pouvoir les traiter précocement.

Dans la physiopathologie septique, la mise en place de dysfonctions d'organes signe une aggravation de l'état du patient et a un impact fort sur le pronostic vital. Dans l'étude de Angus *et al.*, les patients ayant une seule dysfonction d'organe avaient un pourcentage de mortalité de 21 %, alors que chez les patients ayant 2, 3 ou au moins 4 défaillances d'organes les pourcentages étaient respectivement de 44 %, 64,5 % et 76 % (6). Ainsi l'utilisation de biomarqueurs apportant de l'information précoce sur la dysfonction des organes constitue une piste intéressante pour stratifier les patients par groupes de sévérité. Levy *et al.* ont mis en évidence chez des patients en sepsis sévère que l'évolution dans les 48 premières heures de la défaillance cardio-vasculaire, rénale et pulmonaire étaient les plus informatives en termes de prédiction du risque de mortalité à 28 jours (584). Dans une cohorte de 971 patients avec une suspicion de sepsis, 3 biomarqueurs (sur 9 testés) ont été retenus pour leur valeur prédictive du risque de développer un sepsis sévère ou un choc septique dans les 72 heures suivant

l'admission aux urgences. Ces biomarqueurs étaient la protéine C, l'*interleukin-1 receptor antagonist* et la *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) représentatifs respectivement du système de la coagulation, du système inflammatoire et de la fonction rénale (677). Prenons plus particulièrement l'exemple de NGAL qui est une molécule actuellement très étudiée comme biomarqueur représentatif de la défaillance rénale. C'est une protéine sécrétée qui a de multiples fonctions (ex. : fixation et transport de nombreux composés, propriété antibactérienne par séquestration du fer, rôle dans la résolution cellulaire faisant suite à une lésion) et qui peut être dosée dans l'urine ou le sang circulant (678). Son expression génique est régulée par celle du NF- κ B et est prédominante dans l'organisme au niveau du tissu rénal. Un autre avantage est que son expression ARNm est augmentée dans les quelques heures qui suivent l'atteinte rénale (678). Dans plusieurs cohortes de patients de réanimation, il a été observé que les concentrations plasmatiques ou urinaires de NGAL étaient augmentées 24 heures avant le diagnostic d'insuffisance rénale aiguë basé sur la classification *Risk-Injury-Failure-Loss-Endstage renal disease* (RIFLE), reposant sur la mesure de la concentration sérique en créatinine et le débit urinaire (679, 680). Les performances de NGAL plasmatique pour le diagnostic d'insuffisance rénale aiguë se sont révélées intéressantes avec une AUC observée entre 0,78 et 0,92 dans plusieurs cohortes de patients (679, 681, 682). Ainsi NGAL pourrait constituer une alternative intéressante à la mesure de la créatinine sérique comme marqueur de la défaillance rénale (678, 682).

Sur la base des résultats précédents, il semble que la recherche de biomarqueurs caractéristiques des différents systèmes cardio-vasculaire, rénal, pulmonaire, de la coagulation et/ou de l'inflammation/immunité soit pertinente pour permettre une stratification des patients par risque de gravité et ainsi cibler les patients devant être monitorés régulièrement et/ou traités en urgence et de manière agressive. Cependant, bien que de nombreux biomarqueurs aient été étudiés pour évaluer la sévérité et/ou la défaillance d'organe des patients septiques, aucun ne semble présenter à lui seul de performances diagnostiques ou pronostiques suffisantes pour avoir un intérêt en clinique (78). Une autre approche consiste à utiliser la transcriptomique. Dans une cohorte de 98 enfants en choc septique, un panel de 100 gènes a permis de différencier les patients en trois sous-groupes A, B et C, à partir d'un prélèvement sanguin ponctionné dans les 24 premières heures après leur admission en réanimation. Le sous-groupe A regroupait 28 patients avec une fréquence de décès, une sévérité (mesurée par le score *Pediatric risk of mortality* PRISM) et un nombre de défaillance d'organe plus important que les deux autres groupes (683). Une telle classification des patients sur la base de l'expression d'un panel de gènes pourrait donc avoir une application en clinique. Pour

faciliter l'interprétation en routine de ces résultats, cette même équipe travaille sur l'utilisation d'un programme qui génère une représentation graphique couleur en mosaïque de l'expression des gènes sélectionnés, et permet visuellement de classer les patients dans l'un des trois sous-groupes A, B et C (**Figure 42**) (684).

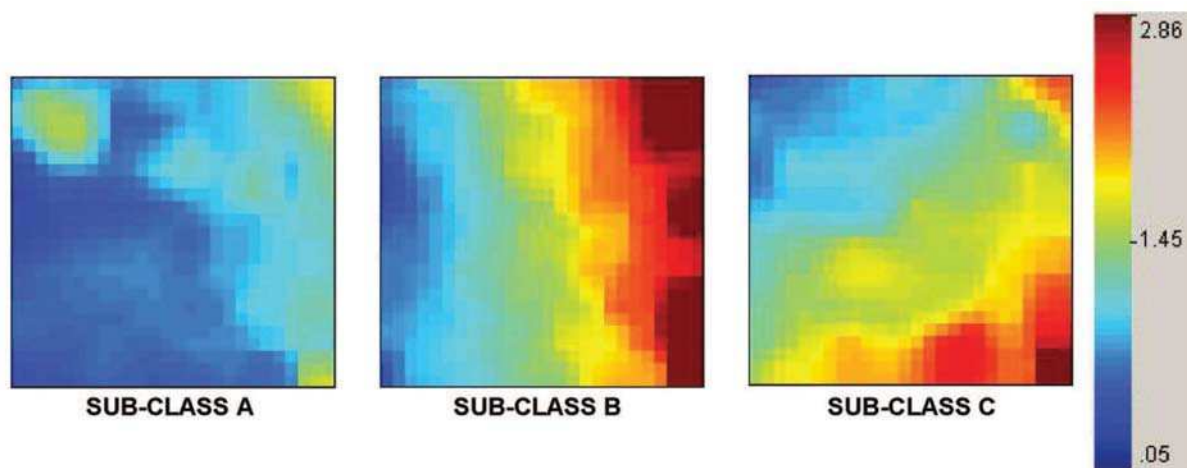


Figure 42 : Exemples de représentations graphiques couleur en mosaïque de profils géniques permettant de stratifier les patients en 3 groupes de sévérité (684)

2.2.4. Concept de théragnostic

Une autre utilisation importante à développer avec les biomarqueurs est leur valeur théragnostique c'est-à-dire d'aide à la sélection des patients à traiter par une thérapeutique particulière (et au suivi de leur réponse à ces thérapeutiques). La notion de théragnostic est apparue en 1998 en oncologie avec la mise sur le marché simultanément du trastuzumab (Herceptin[®], anticorps monoclonal humanisé dirigé contre *Human epidermal growth factor receptor 2* [HER2]) dans le traitement du cancer du sein et du test permettant d'évaluer l'expression protéique tumorale de HER2, car le trastuzumab n'est indiqué que chez les patientes qui ont une sur-expression tumorale de cette protéine (685). Une stratégie thérapeutique similaire pourrait être développée dans le traitement des patients septiques. L'exemple de l'échec des thérapeutiques immunomodulatrices anti-inflammatoires chez ces patients reflète bien la nécessité de caractériser le statut immuno-inflammatoire des patients afin de sélectionner ceux pour qui le traitement devrait être bénéfique (218, 562). Il a été proposé que l'expression de HLA-DRm soit utilisée pour détecter les dysfonctions immunitaires, initier et monitorer l'effet de traitements immunomodulateurs (647). En effet, plusieurs études cliniques ayant ciblé les patients (en état d'immunodépression) à traiter avec des molécules immunostimulantes sur la base de leur expression de HLA-DRm, ont donné des résultats très intéressants. En 1997, Döcke *et al.* ont sélectionné neuf patients ayant une expression de HLA-DRm < 30 %, à qui ils ont administré de l'IFN- γ . Rapidement le

traitement a eu pour effet d'améliorer chez ces patients l'expression de HLA-DRm (ce qui constitue l'effet biologique attendu du traitement et témoigne de l'efficacité de l'IFN- γ administré) et la fonctionnalité des monocytes (évaluée *in vitro*). Au niveau clinique 8 des 9 patients ont résolu leur sepsis peu de temps après l'arrêt du traitement (304). En 2002 une étude contre placebo a été menée chez 21 polytraumatisés ciblés sur le même critère que l'étude précédente (expression de HLA-DRm < 30 % dans le LBA). Pour les onze patients recevant de l'IFN- γ , leur expression de HLA-DRm a été significativement augmentée par le traitement ainsi que les concentrations en IL-1 β . Au contraire les concentrations en IL-10 étaient diminuées dans ce liquide. Cliniquement, les patients traités ont développé significativement moins d'épisodes de pneumopathies induites par la ventilation mécanique et leur fréquence de survie a été améliorée par rapport aux patients recevant le placebo (sans cependant atteindre le seuil de significativité vu le nombre faible de patients inclus) (512). Plus récemment, Meisel *et al.* ont traité 19 patients en sepsis sévère ou en choc septique avec du GM-CSF contre 19 autres patients recevant un placebo. Le critère d'inclusion était un état d'immunosuppression mesuré par une faible expression de HLA-DRm (< 8000 Ac/cellules) deux jours consécutifs. Chez les patients traités, le GM-CSF a permis de restaurer *in vivo* l'expression de HLA-DRm ainsi que la libération *in vitro* de cytokines pro-inflammatoires (en réponse à du LPS ou un agoniste des récepteurs TLR2). Du point de vue clinique, le traitement par GM-CSF s'est accompagné d'une baisse significative de la sévérité de l'état septique (évaluée par le score APACHE II) par rapport à celle mesurée à l'entrée de l'étude, ce qui n'a pas été observé chez les patients sous placebo. Aucun effet bénéfique en termes de survie n'a été mis en évidence chez les patients traités mais l'étude n'avait pas été conçue pour cela (nombre insuffisant de patients) (305).

Comme en témoignent les études précédentes, la preuve de concept et l'intérêt biologique semblent être démontrés quant à l'intérêt de stratifier les patients immunodéprimés sur la base de leur expression de HLA-DRm, pour pouvoir traiter par des molécules immunostimulantes ceux qui en ont le plus besoin. Il reste cependant à définir une valeur seuil de HLA-DRm pour cibler les patients pouvant potentiellement recevoir un tel traitement. Des essais cliniques multicentriques et le recours à des procédures standardisées de mesure de HLA-DRm seront nécessaires pour définir ces seuils (237). L'étape suivante sera ensuite de mesurer l'impact clinique de cette stratégie thérapeutique sur la mortalité et la survenue d'infections nosocomiales dans des essais cliniques contrôlés incluant des cohortes importantes de patients (520, 521).

D'autres molécules pourraient être proposées pour mesurer l'état fonctionnel du système immunitaire des patients septiques avant d'instaurer une thérapeutique corrective : c'est le cas

par exemple de l'expression des molécules co-régulatrices inhibitrices comme les molécules du système PD-1 dont la sur-expression est associée à un « épuisement » lymphocytaire. Ainsi, la mesure de plusieurs aspects de la réponse immune (monocytaire et lymphocytaire) permettrait d'obtenir un profil de l'état d'activation ou d'anergie du système immunitaire, ce qui constitue une étape essentielle à l'instauration d'un traitement immunomodulateur le plus adapté aux patients (237, 686). L'IL-7 et les anticorps bloquants le système PD-1 ou CTLA-4 sont des thérapeutiques immunostimulatrices qui ont donné des résultats très encourageants dans les modèles animaux et qui représentent des pistes intéressantes de thérapeutiques chez les patients septiques (**Figure 43**) (539, 686) car compatibles avec une approche théragnostique.

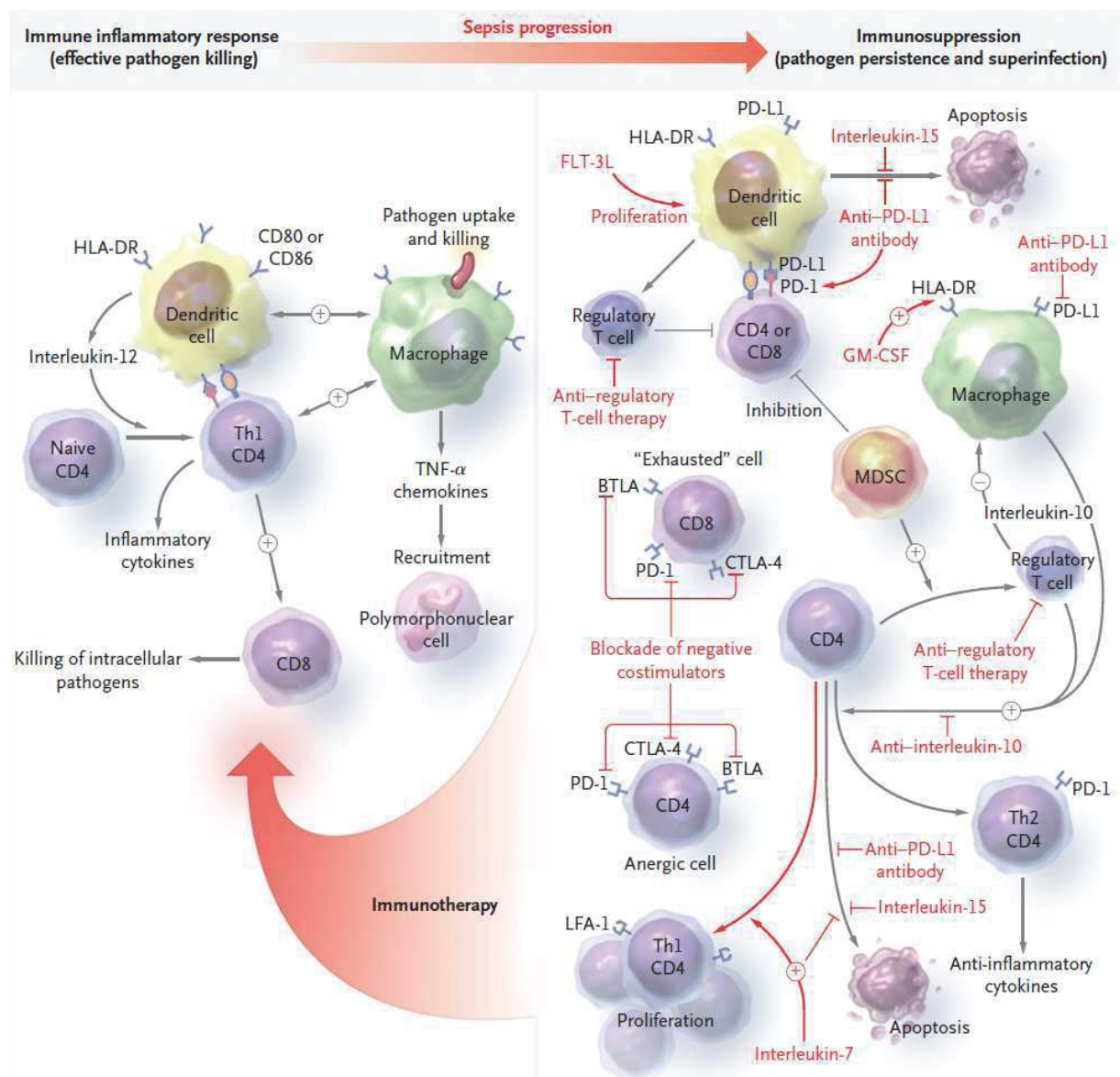


Figure 43 : Exemples de molécules potentiellement intéressantes pour réverser l'immunosuppression induite par les états septiques et présentant un intérêt théragnostique (539)

L'étude des cellules dendritiques est un autre versant du système immunitaire à explorer. Récemment, il a été observé chez des patients en choc septique qu'une déplétion en cellules dendritiques myéloïdes persistant pendant 7 jours après le choc était associée à un risque accru de survenue d'infections nosocomiales (620). Une déplétion importante de ces cellules pourrait constituer un critère de sélection pour évaluer dans un essai clinique l'intérêt de FLT3L (facteur de croissance essentiel dans le développement des cellules dendritiques) chez les patients septiques.

Au contraire, comme observé dans l'**article 8** de ce document, l'utilisation des immunoglobulines à doses substitutives comme thérapeutique adjuvante du sepsis semble peu justifiée. En effet, l'hypogammaglobulinémie mesurée chez les patients septiques ne serait que le reflet d'une hémodilution, comme nous l'avons mis en évidence par le dosage sérique des immunoglobulines circulantes des patients (non pris en compte dans les études précédentes) en parallèle de celle des protéines sériques. Cela n'exclut pas l'utilisation des immunoglobulines sériques à fortes doses à visée anti-inflammatoire, mais leur administration devrait être initiée seulement après une évaluation préalable du statut immunitaire des patients. Néanmoins une étude très récente conduite chez près de 3 500 nouveaux-nés ayant une infection sévère n'a montré aucun effet bénéfique de l'administration d'immunoglobulines G sur la mortalité ou le risque de complications majeures (687).

Brièvement, une autre application des marqueurs thérapeutiques est l'identification des patients à risque de présenter un effet indésirable grave suite à l'administration d'une thérapeutique. Cela met en jeu la pharmacogénétique qui est l'étude des déterminants génétiques pouvant faire varier la réponse à une thérapeutique donnée, et affectant notamment le métabolisme des molécules administrées (668, 685).

2.2.5. Prédiction du risque d'infection secondaire

Les patients septiques sont une population à haut risque de développer des infections nosocomiales du fait des dysfonctions immunitaires qu'ils présentent (43, 55, 439, 440). De plus, les infections secondaires constituent un facteur de mauvais pronostic pour ces patients (688). Un ou des biomarqueur(s) identifiant les patients les plus à risque de présenter une infection nosocomiale, permettrait(en)t de prendre des mesures préventives pour réduire le risque infectieux telles qu'une recherche intensifiée d'infection (ex. : imagerie ou prélèvements sanguins, urinaires etc. plus fréquents), l'isolement du patient, un usage limité des dispositifs médicaux invasifs, ou l'administration potentielle de molécules immunostimulantes. Peu de biomarqueurs ont été étudiés pour une telle indication. Dans une

étude récente menée par Landelle *et al.* incluant plus de 200 patients en choc septique, une expression réduite de HLA-DRm aux jours J3-4 et J6-9 était indépendamment associée à un risque accru de survenue d'infections nosocomiales (Hazard ratio [HR]_{J3-4} = 2,52 ; IC95% 1,20-5,30 ; p=0,02 et HR_{J6-9} = 2,18 ; IC95% 1,04-4,59 ; p=0,04) après ajustement sur des paramètres eux-mêmes en lien avec le risque d'infection secondaire tels que les scores de sévérité, l'intubation des patients ou la mise en place de cathéters centraux veineux (307). Comme vu dans l'**article 5** de notre travail, chez les patients polytraumatisés, l'expression de HLA-DRm apporte également de l'information en termes de prédiction du risque d'infection nosocomiale (OR = 5,41, IC95% 1,42-20,52 ; p = 0,013) après ajustement sur plusieurs paramètres évaluant la sévérité des traumatismes (ex. : les scores SAPS II et ISS). Dans une étude menée sur une cohorte hétérogène de patients hospitalisés en réanimation (patients septiques, polytrauma, post-opératoire etc.), il a été montré que la pente d'expression de HLA-DRm en fonction du temps apportait de l'information sur le risque d'infection nosocomiale : plus cette pente était faible plus elle était associée à un risque important d'infection nosocomiale (290). Un autre paramètre immunologique associé au risque d'infection secondaire chez les patients en choc septique semble être la persistance d'une déplétion en cellules dendritiques myéloïdes (mDC) 7 jours après le choc (OR du rapport mDC_{J1}/mDC_{J7} = 22 ; p = 0,005) dans une analyse univariée (620).

D'autres biomarqueurs sans lien direct avec le système immunitaire ont aussi été étudiés dans cette indication. Bahrami *et al.* ont mesuré le NT-proCNP dans une cohorte de patients polytraumatisés. Ils ont observé que chez les patients sans traumatisme crânien, l'élévation du NT-proCNP avait lieu 2 à 3 jours avant le diagnostic clinique de sepsis. La valeur pronostique de cette pro-hormone a été mesurée par analyse ROC avec une AUC de l'ordre de 0,844 (IC95% 0,809-0,879) pour la période de temps comprise entre 2 et 6 jours post-traumatisme, cependant les données n'étaient pas censurées chez les patients ayant développé une infection (689). Concernant les 4 pro-hormones CT-proET-1, CT-proAVP, MR-proADM et MR-proANP, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur leur valeur prédictive des infections nosocomiales. Les résultats de l'**article 3** de ce travail indiquent un possible apport d'information de MR-proADM dans la prédiction de ce risque. Néanmoins, l'étude initiale n'était pas dimensionnée (en termes d'effectif) pour évaluer le risque d'infections nosocomiales. Cette piste reste à explorer d'autant plus que l'ADM possède des propriétés anti-inflammatoires (175).

La transcriptomique peut aussi apporter de l'information en termes de prédiction du risque d'infections nosocomiales. Une première étude menée sur une cohorte de 90 traumatisés a

consisté à monitorer ces patients à partir de leur entrée en réanimation jusqu'à leur sortie du service ou, pour les patients qui ont développé une infection, jusqu'à 3 jours après l'apparition du sepsis. Dans les 48 heures précédant la détection de l'infection, 459 gènes ont pu être identifiés avec une expression différente entre les deux groupes de patients (infecté ou non). Ces gènes ont été triés en 11 voies ou systèmes biologiques dont 10 d'entre eux étaient en lien étroit avec le système inflammatoire (690). Une étude plus récente menée dans une cohorte de patients différente a conforté ces premiers résultats encourageants. Hinrichs *et al.* ont mesuré l'expression de 23 gènes dans une cohorte de 220 patients ayant subi une opération chirurgicale invasive, pour évaluer l'existence d'une différence d'expression entre les patients qui développent ou non un sepsis après une chirurgie (abdominale ou thoracique). Au total, 4 patients ont développé un sepsis et 16 un sepsis sévère dans les 14 jours après l'opération. A partir du prélèvement sanguin réalisé le lendemain de l'opération, l'expression de trois gènes était significativement différente entre les deux groupes et permettait de les discriminer avec de bonnes performances diagnostiques. Ces trois gènes étaient le TNF, l'IL-1B et le CD3D. L'association des trois gènes permettait de discriminer les deux groupes de patients avec une AUC à 0,918 (IC95% 0,826-1,009) et une valeur prédictive négative à 98,3 % (351). Ces deux études montrent donc que la transcriptomique peut apporter de l'information très précocement, bien avant l'expression clinique d'une infection, et pourrait constituer une avancée majeure dans la prise en charge des patients.

2.2.6. Panel de biomarqueurs

Un unique biomarqueur peut apporter de l'information sur un aspect biologique particulier, mais il ne peut à lui seul renseigner la complexité du processus septique qui évolue rapidement au cours du temps. C'est pourquoi la combinaison de plusieurs biomarqueurs, en complément de données cliniques, pourrait permettre d'améliorer la caractérisation et donc la prise en charge des patients septiques (78, 691).

2.2.6.1. Association de plusieurs biomarqueurs

Comme nous l'avons vu dans l'**article 1** de ce travail, l'association sous forme de paire de deux pro-hormones apporte plus d'informations prédictives de la mortalité qu'une seule pro-hormone. L'association de plusieurs biomarqueurs semble aussi pouvoir améliorer leur valeur diagnostique. En effet, l'association sous forme de paire de deux paramètres en lien avec le système immuno-inflammatoire (expression de CD64 sur les PNN et concentration sérique en *LPS-binding protein*) a montré les meilleures performances diagnostiques pour détecter une

infection chez des enfants hospitalisés en réanimation avec un SIRS et une suspicion clinique d'infection par rapport à l'utilisation de ces mêmes paramètres considérés seuls (660). De même dans une cohorte de 151 patients admis aux urgences et présentant au moins deux critères de SIRS, l'association de 6 biomarqueurs majoritairement en lien avec le système immuno-inflammatoire (ex. : PCT, CRP, nombre de PNN et sTREM-1) avait une valeur diagnostique d'infection bactérienne intéressante avec une AUC à 0,88 (IC95% 0,81-0,92). Cette AUC était supérieure aux AUC de chacun des biomarqueurs analysés seuls (et variant entre 0,50 et 0,81) (692). Dans une revue récente, l'association de plusieurs biomarqueurs dont la CRP, la PCT, *Serum amyloid A* ou *IFN- γ inducible protein-10* a été proposée pour pouvoir différencier le diagnostic d'infection bactérienne, virale ou fongique (**Figure 44**) (693).

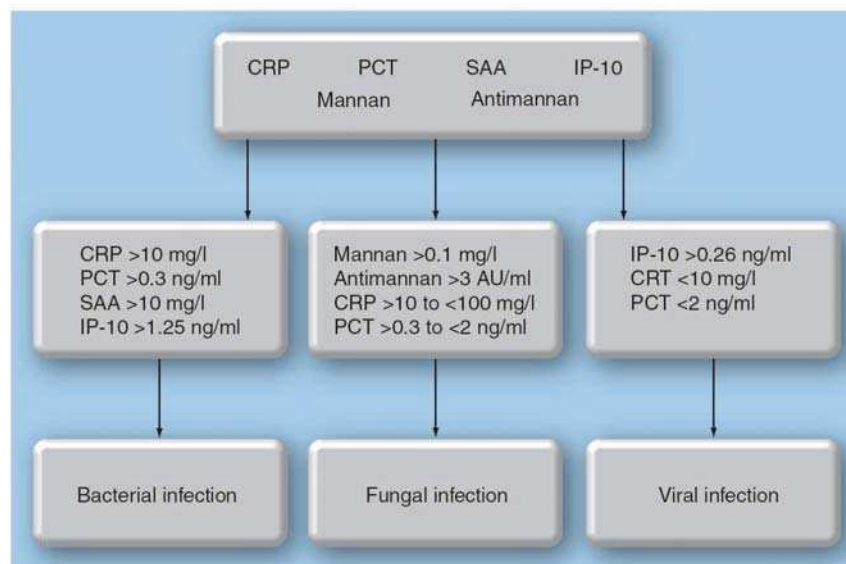


Figure 44 : Stratégie potentielle pour diagnostiquer différents types de causes infectieuses du sepsis à partir d'une association de biomarqueurs (693)

IP-10 : IFN- γ -inducible protein-10, SAA : Serum amyloid A

Un autre aspect intéressant est l'association de plusieurs biomarqueurs caractérisant différents aspects de la physiopathologie. En effet, cela limite le risque d'associer des paramètres corrélés entre eux et porteurs d'information en partie commune, donc plus limitée que celle apportée de manière complémentaire par des biomarqueurs caractéristiques de systèmes/organes différents (694). Dans une étude récente menée chez des patients ayant développé une pneumonie induite par ventilation mécanique, les auteurs ont évalué l'intérêt d'associer (en complément des données cliniques) un biomarqueur en lien avec la réponse hémodynamique (MR-proANP) et un biomarqueur de l'infection (PCT) pour prédire le risque de mortalité (695). Après analyse ROC, l'AUC du score de sévérité SAPS II était de 0,736 (IC95% 0,669-0,803). Sa valeur prédictive était significativement améliorée par l'ajout de

MR-proANP ($AUC_{SAPS II + proANP} = 0,859$, IC95% 0,804-0,914 ; $p=0,024$) et était encore augmentée par l'association avec la PCT ($AUC_{SOFA + prANP + PCT} = 0,895$, IC95% 0,847-0,943 ; $p=0,003$). La valeur prédictive du score SOFA était aussi améliorée par la double association des biomarqueurs, sans pour autant atteindre le seuil de significativité (695).

Une étude multicentrique menée chez 971 patients suspectés d'être septiques et admis aux urgences, s'est intéressée à l'association de trois biomarqueurs caractéristiques de trois systèmes différents : l'hémostase (avec la protéine C), l'inflammation (avec l'*interleukin-1 receptor antagonist*) et la dysfonction rénale (avec la *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) (677). Par analyse ROC puis dans une analyse multivariée, ces trois biomarqueurs associés sous forme d'un score apportaient de l'information en termes de prédiction de la mortalité ($AUC = 0,79$ et $OR=1,56$, IC95% 1,31-1,85 ; $p=0,001$) ou de développement d'un choc septique dans les 72 heures après l'admission ($AUC = 0,77$ et $OR=1,41$, IC95% 1,31-1,51 ; $p=0,001$) indépendamment d'autres paramètres comme l'âge, la pression artérielle systolique ou l'urémie (677).

2.2.6.2. Notion de temps

La physiopathologie septique étant rapidement évolutive, il peut être intéressant pour une information recherchée de doser certains biomarqueurs de manière séquentielle afin d'obtenir leur profil d'évolution au cours du temps ou d'utiliser des biomarqueurs différents en fonction du temps. Par exemple, dans les **articles 1 et 2** de ce manuscrit, nous avons observé que très précocement (aux jours J1-2 et J3-5 après le choc) la CT-proAVP avait la valeur prédictive de la mortalité la plus intéressante, alors que pour les deux pro-hormones MR-proANP et MR-proADM, leur valeur prédictive s'améliorait avec le temps. Concernant la mesure de l'expression de HLA-DRm, il semble que ce ne soit pas tant l'intensité de la baisse d'expression qui soit informative en termes de prédiction du risque de mortalité, mais plutôt la persistance de cette baisse dans le temps chez les patients septiques (286, 308, 313). En effet, chez des patients en choc septique ou ayant une pancréatite aiguë par exemple, l'expression de HLA-DRm est effondrée très précocement (nadir à J1-2 après le choc) autant chez les patients survivants que les non-survivants (286, 308, 313). Cependant, les patients survivants restaurent leur expression de HLA-DRm une semaine après le choc septique, alors que les patients non survivants présentent une persistance de cette baisse (286, 298, 313). Dans une étude de Monneret *et al.*, la différence entre survivants et non-survivants apparaissait dès J3-4 après le choc septique (308) (résultat confirmé dans une étude suivante du même groupe (307)). La persistance d'une faible expression de HLA-DRm (<30 %) était associée à un risque 6,5 fois plus important de décéder par rapport aux autres patients en choc,

après ajustement sur plusieurs paramètres cliniques (dont l'âge, le sexe, un score de sévérité ou le nombre de co-morbidités) (308).

De manière similaire, la pente d'expression de HLA-DRm en fonction du temps est informative sur la prédiction du risque de développer une infection nosocomiale chez des patients septiques ou polytraumatisés (290). De même dans l'**article 5** de ce travail, l'évolution de l'expression de HLA-DRm entre les jours J3-4 et J1-2 apportait l'information prédictive du risque de développer une infection secondaire dans une cohorte de patients polytraumatisés.

Dans une étude de Levy *et al.*, les auteurs se sont intéressés à la valeur prédictive de la mortalité des paramètres constituant le score SOFA et reflétant donc les dysfonctions d'organe se mettant en place chez des patients en sepsis sévère. Dans une analyse multivariée, ils ont observé que l'évolution des paramètres du SOFA à un temps donné par rapport à leur valeur initiale (J0) était plus fortement associée au risque de mortalité que la valeur statique initiale de ce même paramètre (584). Ils en ont déduit que le risque de décès du patient était davantage lié à la réponse (ou à l'absence de réponse) du patient vis-à-vis des actions thérapeutiques menées qu'au degré de sévérité de l'atteinte à l'arrivée dans le service de réanimation (584). Dans une autre étude menée rétrospectivement à partir des données biologiques de patients inclus dans le groupe placebo de l'étude PROWESS, un score renseignant les anomalies de l'hémostase a été établi et sa valeur prédictive de la mortalité étudiée. L'évolution entre J0 et J1 des 3 paramètres (activité de l'anti-thrombine III, dosage des D-dimères et temps de prothrombine) était plus informative que l'utilisation des biomarqueurs au moment de l'inclusion (J0). L'intérêt du score a été évalué par le fait qu'il améliorait la valeur prédictive du score APACHE II de manière significative (AUC respective à 0,74 versus 0,69, $p = 0,0007$) (696). De nouveau, la mesure dynamique de paramètres biologiques semblait plus intéressante qu'une seule détermination statique.

2.2.6.3. Association aux données cliniques

Les biomarqueurs même les plus informatifs ne peuvent pas remplacer les paramètres cliniques. Au contraire, ils doivent être utilisés en complément de la clinique.

Plusieurs études se sont intéressées à l'intérêt d'associer des biomarqueurs à des scores cliniques pour prédire le risque de mortalité. Trois études menées sur des cohortes de patients présentant une pneumopathie communautaire ont comparé les AUC (obtenues par analyse ROC) du score de sévérité PSI seul par rapport à son association à une ou deux pro-hormones (proADM, proET-1, ou proAVP associée à proANP). Les valeurs étaient à chaque fois augmentées par l'association d'une pro-hormone mais sans atteindre la significativité (198,

200, 594). Plus récemment, dans une cohorte de 101 patients ayant une pneumopathie induite par ventilation mécanique, l'ajout des valeurs de proANP le jour du diagnostic ont amélioré significativement l'AUC des scores SOFA et SAPS II à 0,86 et 0,85 respectivement. Sur la base de ces résultats, les auteurs ont suggéré d'utiliser un nomogramme combinant proANP avec l'un des scores cliniques. Ce système permet d'améliorer facilement la stratification des patients par risque de mortalité, plus particulièrement chez les patients ayant un score SAPS II modérément élevé (et qui constituent le groupe dont la prédiction du risque de mortalité est sans doute la plus difficile à prévoir) (695). Par exemple, un patient ayant un SAPS II à 50 peut avoir un risque de mortalité qui varie de 20 % à 90 % s'il a une concentration de proANP de 200 pM ou 1400 pM respectivement (**Figure 45**) (695).

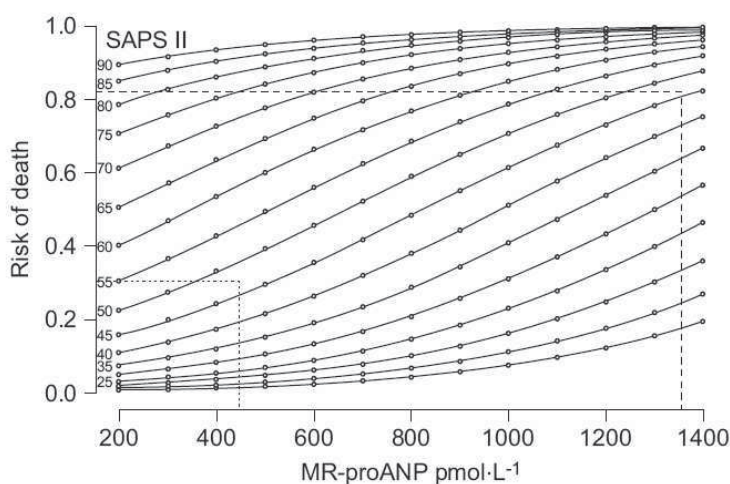


Figure 45 : Exemple d'un nomogramme permettant d'évaluer le risque de mortalité des patients en combinant les concentrations plasmatiques en MR-proANP avec le score de sévérité SAPS II (695)

Un autre moyen de combiner l'information de données cliniques et de biomarqueurs est le calcul de score attribuant un nombre de points à chaque paramètre en fonction des résultats obtenus dans un modèle de régression. Dans une étude récente avec une cohorte de 877 patients ayant une pneumopathie communautaire, un score de risque de mortalité a ainsi été calculé en incluant des données cliniques (telles que l'âge, le sexe, la température corporelle, certaines co-morbidités) et des biomarqueurs (proADM et CRP). La valeur maximale du score était de 15 points (**Tableau 11**). Les biomarqueurs représentaient une part importante du calcul puisqu'ils pouvaient apporter jusqu'à 6 points, soit autant de points que ceux attribués à un patient de plus de 82 ans (3 points) ayant une broncho-pneumopathie obstructive chronique (1 point) et une pathologie cancéreuse (2 points) (697). Le score permettait une bonne discrimination des patients survivants et non-survivants à 18 mois (log rank $p < 0,001$) (697).

Parameter	HR (95% CI)	p-value	Risk points
Males	1.7 (1.2–2.5)	0.003	1
No chills	1		1
Chills	0.6 (0.4–1)	0.049	0
Initial temperature in quartiles			
<37.0°C	1		1
37.0–37.9°C	0.8 (0.5–1.3)	0.391	1
37.9–38.7°C	0.9 (0.6–1.5)	0.749	1
>38.7°C	0.4 (0.2–0.6)	<0.001	0
Age in quartiles			
<59 yrs ^a	1		0
59–73 yrs	1.5 (0.7–3.1)	0.255	1
73–82 yrs	2 (1–4)	0.066	2
>82 yrs	3 (1.5–6.1)	0.002	3
Comorbidities			
Chronic heart failure	0.8 (0.6–1.2)	0.369	0
COPD	1.5 (1.1–2.1)	0.020	1
Neoplastic disease	2.5 (1.7–3.7)	<0.001	2
Chronic renal failure	1 (0.7–1.5)	0.958	0
Initial blood markers			
ProADM			
<0.83 nmol·L ⁻¹ ^{a,+}	1		0
0.83–1.22 nmol·L ⁻¹	0.9 (0.5–1.7)	0.821	0
1.22–1.97 nmol·L ⁻¹	1.9 (1.1–3.5)	0.032	2
>1.97 nmol·L ⁻¹	3.3 (1.7–6.2)	<0.001	3
CRP			
<105 mg·dL ⁻¹ ^{a,+}	1		3
105–181 mg·dL ⁻¹	0.8 (0.5–1.2)	0.288	2
181–265 mg·dL ⁻¹	0.7 (0.5–1.2)	0.187	1
>265 mg·dL ⁻¹	0.3 (0.2–0.5)	<0.001	0

Tableau 11 : Exemple d'un score de risque de mortalité associant des paramètres cliniques et des biomarqueurs (établi à partir d'une analyse de régression multivariée) (697)

COPD : chronic obstructive pulmonary disease

Comme dernier exemple, des algorithmes de décision ont été proposés pour guider l'antibiothérapie à partir des concentrations sériques en PCT. Ces algorithmes associent des critères cliniques tels que la sévérité de l'atteinte ou l'évolution des symptômes cliniques avec des seuils de décision de PCT déterminés (**Tableau 12**) (698). Deux méta-analyses récentes ont montré que l'utilisation de ces algorithmes permettait de réduire la prescription d'antibiotiques et/ou la durée de l'antibiothérapie par rapport à la pratique courante, sans pour autant s'accompagner d'une fréquence plus importante d'infection persistante ou d'épisode de sur-infection (698, 699). Chez les patients les plus sévères, les seuils décisionnels sont particulièrement intéressants pour aider dans la décision de réduire l'antibiothérapie (lorsque les concentrations en PCT diminuent sous un certain seuil). Au contraire en cas d'infection peu sévère, l'algorithme semble plus intéressant pour aider au choix de la prescription (ou non) des antibiotiques aux patients (698).

A				
Evaluation at time of admission				
PCT result	< 0.10 µg/L	< 0.25 µg/L	≥ 0.25 µg/L	> 0.50 µg/L
Recommendation regarding use of Abx	Strongly discouraged	Discouraged	Encouraged	Strongly encouraged
Overruling the algorithm	Consider use of antibiotics if patients are clinically unstable, have strong evidence of pneumonia, are at high risk (ie, COPD GOLD III-IV), or need hospitalization			
Follow-up/other comments	Follow-up only needed if no symptom resolution after 1 to 2 days; if clinical situation is not improving; consider Abx if PCT level increases to ≥ 0.25 µg/L		Clinical reevaluation as appropriate	
B				
Evaluation at time of admission				
PCT result	< 0.10 µg/L	< 0.25 µg/L	≥ 0.25 µg/L	> 0.50 µg/L
Recommendation regarding use of Abx	Strongly discouraged	Discouraged	Encouraged	Strongly encouraged
Overruling the algorithm	Consider alternative diagnosis, or Abx if patients are clinically unstable, are at high risk for adverse outcome (eg, PSI classes IV-V, immunosuppression), or have strong evidence of a bacterial pathogen			
Follow-up/other comments	Reassess patients' condition and recheck PCT level after 6 to 12 hours if no clinical improvement is observed		Recheck PCT level every 2 to 3 days to consider early cessation of Abx	
Follow-up evaluation every 2 to 3 days				
PCT result	< 0.10 µg/L	< 0.25 µg/L	≥ 0.25 µg/L	> 0.50 µg/L
Recommendation regarding use of Abx	Cessation of therapy strongly encouraged	Cessation of therapy encouraged	Cessation of therapy discouraged	Cessation of therapy strongly discouraged
Overruling the algorithm	Consider continuation of Abx if patients are clinically not stable			
Follow-up/other comments	Clinical reevaluation as appropriate		Consider treatment to have failed if PCT level does not decrease adequately	
C				
Evaluation at time of admission				
PCT result	< 0.25 µg/L	< 0.50 µg/L	≥ 0.50 µg/L	> 1.0 µg/L
Recommendation regarding use of Abx	Strongly discouraged	Discouraged	Encouraged	Strongly encouraged
Overruling the algorithm	Empirical therapy recommended in all patients with clinical suspicion of infection			
Follow-up/other comments	Consider alternative diagnosis; reassess patients condition and recheck PCT level every 2 days		Reassess patients' condition and recheck PCT level every 2 days to consider cessation of Abx	
Follow-up evaluation every 1 to 2 days				
PCT result	< 0.25 µg/L or drop by > 90%	< 0.50 µg/L or drop by > 80%	≥ 0.50 µg/L	> 1.0 µg/L
Recommendation regarding use of Abx	Cessation of Abx strongly encouraged	Cessation of Abx encouraged	Cessation of Abx encouraged	Cessation of Abx strongly encouraged
Overruling the algorithm	Consider continuation of Abx if patients are clinically unstable			
Follow-up/other comments	Clinical reevaluation as appropriate		Consider treatment to have failed if PCT level does not decrease adequately	

Tableau 12 : Exemple d'algorithmes de décision pour guider la thérapeutique antibiotique chez des patients atteints d'infection non pulmonaire peu sévère (A), d'infection pulmonaire modérément sévère (B) ou très sévère (C) (698)

Abx : antibiotics; COPD : chronic obstructive pulmonary disease, GOLD : global initiative for chronic obstructive lung disease, PSI : pneumonia severity index

2.3. Limites actuelles

En dépit des nombreuses études qui ont été conduites sur près de 180 biomarqueurs différents, peu sont actuellement utilisés dans la prise en charge courante des patients septiques (78). Différents éléments participent à la difficulté de valider des biomarqueurs en routine. Tout d'abord, pour un marqueur biologique donné, les résultats d'études menées sans standardisation analytique sont difficiles à comparer. De plus, les seuils décisionnels proposés peuvent s'avérer différents entre les études. Enfin et principalement, la grande hétérogénéité des patients septiques explique la variabilité des résultats (l'âge, les co-morbidités, le site de l'infection, les germes responsables, leurs facteurs de virulence, le nombre de défaillance d'organe, l'état des fonctions hépatique et rénale qui influe sur l'élimination des biomarqueurs solubles, l'impact des traitements administrés aux patients, etc.).

Pour s'affranchir de cette variabilité, des études incluant de larges cohortes de patients sont nécessaires afin de pouvoir s'intéresser à des sous-groupes particuliers comprenant des effectifs suffisants. Cette approche a été développée par Marshall *et al.* dans le cadre des études visant à évaluer l'intérêt des biomarqueurs pour guider la thérapeutique. Les auteurs proposent de doser ces biomarqueurs dans des grandes cohortes de patients, en parallèle à un essai thérapeutique, pour pouvoir déduire rétrospectivement des sous-groupes de patients pour lesquels le traitement a été plus ou moins bénéfique (700).

Une autre difficulté réside dans l'interprétation des nombreux résultats générés dans les études cliniques (par exemple par des outils tels que la transcriptomique) ainsi que l'aspect rapidement évolutif de la physiopathologie septique au cours du temps et l'implication et/ou l'interaction de nombreux systèmes de l'organisme dans la réponse de l'hôte. Des méthodes statistiques permettant d'analyser les systèmes complexes doivent être développées pour prendre en compte simultanément tous ces paramètres. Au final, les outils statistiques permettant de faire la synthèse globale des informations doivent être améliorés pour aider le clinicien à intégrer ces données dans sa décision thérapeutique rapidement au lit du malade.

CONCLUSION

La volonté de mieux caractériser la population de patients septiques est présente depuis de nombreuses années. En 1992 Bone *et al.* ont proposé une définition du SIRS et des différents stades de sévérité de l'état septique. Cette classification s'est avérée insatisfaisante dans la pratique courante et la réflexion s'est orientée vers l'intérêt d'associer des marqueurs biologiques avec des paramètres cliniques. Dans ce sens, le concept du score PIRO a été proposé en 2001, son but étant de mieux prendre en compte l'aspect multifactoriel de la physiopathologie septique. En effet ce score regroupe des caractéristiques physiologiques et génétiques du patient, des paramètres reflétant la réponse ou les dysfonctions d'organes qui se mettent en place, ainsi que des caractéristiques de l'agent infectieux. Les composantes exactes de ce score restent à définir et le choix des paramètres les plus pertinents nécessite une compréhension de la physiopathologie septique dans son ensemble.

Notre travail s'intègre dans ce contexte de caractérisation plus globale des patients septiques. Nous avons montré que certaines pro-hormones cardio-vasculaires dont MR-proADM et CT-proAVP améliorent la stratification des patients par groupe de sévérité, en particulier quand elles sont associées sous forme de paires, ce qui renforce l'idée que plusieurs biomarqueurs sont plus informatifs qu'un seul. Nous avons également observé qu'un même biomarqueur peut apporter une information différente au cours du temps (exemple de la pro-ADM). Concernant le système immunitaire, plusieurs versants doivent être renseignés pour obtenir une vision globale de la réponse immuno-inflammatoire. Au niveau lymphocytaire, nous avons observé que la lymphopénie et la dysfonction lymphocytaire se mettent en place très tôt après le choc septique. Le système co-inhibiteur PD-1 et ses ligands PD-L participent aux mécanismes responsables de cette dysfonction. L'état apoptotique des lymphocytes pourrait être renseigné par l'expression ARNm des molécules BID et FAS. Enfin sur le versant monocytaire, la mesure cinétique (plus qu'une mesure à un instant donné) de l'expression de HLA-DRm, considérée actuellement comme le « gold standard », évalue l'état fonctionnel des monocytes chez les patients septiques ou polytraumatisés et permet de prédire le risque d'infections secondaires. Ces informations seront à prendre en compte dans l'éventuelle définition d'un panel de biomarqueurs visant à monitorer l'immunodépression.

Au-delà de la réponse immuno-inflammatoire, la caractérisation de la réponse à l'infection doit être poursuivie et étendue à tous les systèmes biologiques impliqués dans la

physiopathologie septique de manière à obtenir une vision globale de la réponse de l'hôte et, à terme, définir une thérapeutique ciblée et individualisée.

Cependant, en l'état actuel des connaissances, l'utilisation des biomarqueurs dans la pratique courante clinique reste peu développée et se heurte à la complexité des situations physiopathologiques traitées en réanimation. Des études à grande échelle incluant pratiques standardisées (concernant l'inclusion des patients, le recueil de données et les méthodes analytiques) et évaluation de nombreux biomarqueurs dans des cohortes importantes de patients sont maintenant nécessaires ainsi que le développement de méthodes statistiques adaptées aux systèmes complexes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992; 101(6):1644-55.
2. Vincent JL. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med*. 1997; 25(2):372-4.
3. Marshall JC. SIRS and MODS: what is their relevance to the science and practice of intensive care? *Shock*. 2000; 14(6):586-9.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003; 31(4):1250-6.
5. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003; 348(16):1546-54.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001; 29(7):1303-10.
7. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007; 35(5):1244-50.
8. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med*. 2004; 30(4):580-8.
9. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168(2):165-72.
10. Linde-Zwirble WT, Angus DC. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit Care*. 2004; 8(4):222-6.
11. Wenzel RP. Treating sepsis. *N Engl J Med*. 2002; 347(13):966-7.
12. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006; 34(2):344-53.
13. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, *et al.* Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med*. 2002; 28(2):108-21.
14. Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, *et al.* Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168(1):77-84.
15. Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med*. 2004; 30(4):589-96.
16. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, Young D, Black N, Rowan K. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med*. 2003; 31(9):2332-8.
17. Heron M, Hoyert DL, Murphy SL, Xu J, Kochanek KD, Tejada-Vera B. Deaths: final data for 2006. *Natl Vital Stat Rep*. 2009; 57(14):1-134.
18. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Facing the challenge: decreasing case fatality rates in severe sepsis despite increasing hospitalizations. *Crit Care Med*. 2005; 33(11):2555-62.
19. Weycker D, Akhras KS, Edelsberg J, Angus DC, Oster G. Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2003; 31(9):2316-23.
20. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med*. 2010; 38(5):1276-83.
21. Karlsson S, Ruokonen E, Varpula T, Ala-Kokko TI, Pettila V. Long-term outcome and quality-adjusted life years after severe sepsis. *Crit Care Med*. 2009; 37(4):1268-74.
22. Black NA, Jenkinson C, Hayes JA, Young D, Vella K, Rowan KM, *et al.* Review of outcome measures used in adult critical care. *Crit Care Med*. 2001; 29(11):2119-24.
23. Angus DC, Carlet J. Surviving intensive care: a report from the 2002 Brussels Roundtable. *Intensive Care Med*. 2003; 29(3):368-77.
24. Mitka M. Hospitalizations for extreme conditions mean extreme expenses, study verifies. *JAMA*. 2010; 304(23):2579-80.

25. Brun-Buisson C, Roudot-Thoraval F, Girou E, Grenier-Sennelier C, Durand-Zaleski I. The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Med.* 2003; 29(9):1464-71.
26. Adrie C, Alberti C, Chaix-Couturier C, Azoulay E, De Lassence A, Cohen Y, *et al.* Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J Crit Care.* 2005; 20(1):46-58.
27. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, *et al.* Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med.* 1990; 113(3):227-42.
28. Adrie C, Azoulay E, Francois A, Clec'h C, Darques L, Schwebel C, *et al.* Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal. *Chest.* 2007; 132(6):1786-93.
29. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, *et al.* Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2007; 33(4):606-18.
30. Sprung CL, Sakr Y, Vincent JL, Le Gall JR, Reinhart K, Ranieri VM, *et al.* An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence In Acutely Ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med.* 2006; 32(3):421-7.
31. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med.* 2006; 34(1):15-21.
32. Esper AM, Moss M, Lewis CA, Nisbet R, Mannino DM, Martin GS. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med.* 2006; 34(10):2576-82.
33. Berkowitz DM, Martin GS. Sepsis and sex: can we look beyond our hormones? *Chest.* 2007; 132(6):1725-7.
34. Imahara SD, Jelacic S, Junker CE, O'Keefe GE. The influence of gender on human innate immunity. *Surgery.* 2005; 138(2):275-82.
35. van Eijk LT, Dorresteijn MJ, Smits P, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Gender differences in the innate immune response and vascular reactivity following the administration of endotoxin to human volunteers. *Crit Care Med.* 2007; 35(6):1464-9.
36. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Occurrence and outcomes of sepsis: influence of race. *Crit Care Med.* 2007; 35(3):763-8.
37. Barnato AE, Alexander SL, Linde-Zwirble WT, Angus DC. Racial variation in the incidence, care, and outcomes of severe sepsis: analysis of population, patient, and hospital characteristics. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177(3):279-84.
38. Moss M. Epidemiology of sepsis: race, sex, and chronic alcohol abuse. *Clin Infect Dis.* 2005; 41 Suppl 7:S490-7.
39. Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med.* 2004; 32(2):569-79.
40. Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care.* 2009; 13(2):210.
41. Yende S, Kammerer CM, Angus DC. Genetics and proteomics: deciphering gene association studies in critical illness. *Crit Care.* 2006; 10(4):227.
42. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet.* 2005; 365(9453):63-78.
43. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003; 348(2):138-50.
44. Schubert C. Systems immunology: complexity captured. *Nature.* 2011; 473(7345):113-4.
45. Russell JA. Gene expression in human sepsis: what have we learned? *Crit Care.* 2011; 15(1):121.
46. Clark MF, Baudouin SV. A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Intensive Care Med.* 2006; 32(11):1706-12.
47. Suffredini AF, Chanock SJ. Genetic variation and the assessment of risk in septic patients. *Intensive Care Med.* 2006; 32(11):1679-80.
48. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009; 302(21):2323-9.
49. Murdoch DR. Microbiological patterns in sepsis: what happened in the last 20 years? *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34 Suppl 4:S5-8.
50. Luzzaro F, Ortisi G, Larosa M, Drago M, Brigante G, Gesu G. Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 69(4):363-9.
51. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010; 362(19):1804-13.
52. Opal SM, Calandra T. Antibiotic usage and resistance: gaining or losing ground on infections in critically ill patients? *JAMA.* 2009; 302(21):2367-8.
53. Johnson AP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66 Suppl 4:iv43-iv8.

54. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000; 26 Suppl 1:S64-74.
55. Landelle C, Lepape A, Francais A, Tognet E, Thizy H, Voirin N, *et al.* Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29(11):1054-65.
56. Cohen J, Brun-Buisson C, Torres A, Jorgensen J. Diagnosis of infection in sepsis: an evidence-based review. *Crit Care Med.* 2004; 32(11 Suppl):S466-94.
57. Llewelyn M, Cohen J. Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med.* 2001; 27 Suppl 1:S10-32.
58. Circiumaru B, Baldock G, Cohen J. A prospective study of fever in the intensive care unit. *Intensive Care Med.* 1999; 25(7):668-73.
59. Bauer M, Reinhart K. Molecular diagnostics of sepsis--where are we today? *Int J Med Microbiol.* 2010; 300(6):411-3.
60. Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36 Suppl 2:S6-16.
61. Pletz MW, Wellinghausen N, Welte T. Will polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostics improve outcome in septic patients? A clinical view. *Intensive Care Med.* 2011; 37(7):1069-76.
62. Carrigan SD, Scott G, Tabrizian M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clin Chem.* 2004; 50(8):1301-14.
63. Povoia P. C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Med.* 2002; 28(3):235-43.
64. Povoia P. Serum markers in community-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21(2):157-62.
65. Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66 Suppl 2:ii33-40.
66. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(2):206-17.
67. Herzum I, Renz H. Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock. *Curr Med Chem.* 2008; 15(6):581-7.
68. Christ-Crain M, Muller B. Procalcitonin in bacterial infections--hype, hope, more or less? *Swiss Med Wkly.* 2005; 135(31-32):451-60.
69. Meisner M, Schmidt J, Huttner H, Tschaikowsky K. The natural elimination rate of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function. *Intensive Care Med.* 2000; 26 Suppl 2:S212-6.
70. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2006; 34(7):1996-2003.
71. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7(3):210-7.
72. Barraud D, Gibot S. Triggering receptor expressed on myeloid cell 1. *Crit Care Clin.* 2011; 27(2):265-79.
73. Gibot S, Cravoisy A, Levy B, Bene MC, Faure G, Bollaert PE. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N Engl J Med.* 2004; 350(5):451-8.
74. Jiyong J, Tiancha H, Wei C, Huahao S. Diagnostic value of the soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in bacterial infection: a meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2009; 35(4):587-95.
75. Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(8):903-16.
76. Fischer G, Schneider EM, LL LM, Karcher C, Barth E, Suger-Wiedeck H, *et al.* CD64 surface expression on neutrophils is transiently upregulated in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2001; 27(12):1848-52.
77. Icardi M, Erickson Y, Kilborn S, Stewart B, Grief B, Scharnweber G. CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(12):3914-9.
78. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010; 14(1):R15.
79. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The Pathogenesis of Sepsis. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6:19-48.
80. Efron P, Moldawer LL. Sepsis and the dendritic cell. *Shock.* 2003; 20(5):386-401.
81. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124(4):783-801.
82. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010; 140(6):805-20.
83. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(1):1-5.
84. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17(4):359-65.
85. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(6):446-58.

86. Brown MA, Jones WK. NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Front Biosci.* 2004; 9:1201-17.
87. Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol.* 2008; 214(2):211-23.
88. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 2008; 112(4):935-45.
89. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(3):173-82.
90. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:197-223.
91. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010; 11(9):785-97.
92. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010; 20(1):34-50.
93. Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O'Grady NP. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol.* 1999; 19(4):203-14.
94. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999; 340(6):448-54.
95. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock.* 2001; 16(2):83-96.
96. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008; 112(5):1557-69.
97. MacConmara M, Lederer JA. B cells. *Crit Care Med.* 2005; 33(12 Suppl):S514-6.
98. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008; 454(7203):428-35.
99. Haddad JJ. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297(4):700-13.
100. Kelso A. Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol.* 1998; 76(4):300-17.
101. Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(6):561-80.
102. Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med.* 2008; 26(6):711-5.
103. Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(2):133-42.
104. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(10):791-800.
105. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2007; 220:35-46.
106. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002; 420(6917):885-91.
107. Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2010; 36(8):1286-98.
108. Flynn A, Chokkalingam Mani B, Mather PJ. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail Rev.* 2010; 15(6):605-11.
109. Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, *et al.* Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg.* 2009; 108(6):1841-7.
110. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med.* 2010; 38(2 Suppl):S26-34.
111. Kin NW, Sanders VM. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(6):1093-104.
112. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(4):318-28.
113. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:125-63.
114. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4):595-638.
115. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2007; 35(10):2408-16.
116. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999; 27(7):1230-51.
117. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet.* 2004; 364(9433):545-8.
118. Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med.* 2009; 37(1):291-304.
119. Levy RJ. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock.* 2007; 28(1):24-8.
120. Levy RJ, Piel DA, Acton PD, Zhou R, Ferrari VA, Karp JS, *et al.* Evidence of myocardial hibernation in the septic heart. *Crit Care Med.* 2005; 33(12):2752-6.
121. Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med.* 1993; 328(20):1471-7.

122. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91(10):3527-61.
123. Aird WC. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med*. 2004; 32(5 Suppl):S271-9.
124. Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res*. 2007; 43(4):117-37.
125. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166(1):98-104.
126. Astiz ME, DeGent GE, Lin RY, Rackow EC. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med*. 1995; 23(2):265-71.
127. Linderkamp O, Ruef P, Brenner B, Gulbins E, Lang F. Passive deformability of mature, immature, and active neutrophils in healthy and septicemic neonates. *Pediatr Res*. 1998; 44(6):946-50.
128. De Backer D, Donadello K, Taccone FS, Ospina-Tascon G, Salgado D, Vincent JL. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. *Ann Intensive Care*. 2011; 1(1):27.
129. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*. 2008; 83(3):536-45.
130. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005; 9 Suppl 4:S13-9.
131. Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care*. 2004; 8(6):462-8.
132. Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med*. 2007; 35(9 Suppl):S441-8.
133. Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, *et al.* Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med*. 2010; 36(12):2019-29.
134. Boueiz A, Hassoun PM. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res*. 2009; 77(1):26-34.
135. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003; 101(10):3765-77.
136. Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, *et al.* Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*. 1984; 100(4):483-90.
137. Court O, Kumar A, Parrillo JE. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care*. 2002; 6(6):500-8.
138. Rabuel C, Mebazaa A. Septic shock: a heart story since the 1960s. *Intensive Care Med*. 2006; 32(6):799-807.
139. Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation*. 1986; 73(4):637-44.
140. Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses *in vitro* myocardial cell performance. *J Clin Invest*. 1985; 76(4):1539-53.
141. Hunter JD, Doddi M. Sepsis and the heart. *Br J Anaesth*. 2010; 104(1):3-11.
142. Zanotti-Cavazzoni SL, Hollenberg SM. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care*. 2009; 15(5):392-7.
143. Hoessel LM, Niederbichler AD, Ward PA. Complement-related molecular events in sepsis leading to heart failure. *Mol Immunol*. 2007; 44(1-3):95-102.
144. Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart. *Circulation*. 2007; 116(7):793-802.
145. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Sarma JV, Ward PA. Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med*. 2008; 14(5-6):327-36.
146. Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*. 2007; 35(6):1599-608.
147. Lorts A, Burroughs T, Shanley TP. Elucidating the role of reversible protein phosphorylation in sepsis-induced myocardial dysfunction. *Shock*. 2009; 32(1):49-54.
148. Belcher E, Mitchell J, Evans T. Myocardial dysfunction in sepsis: no role for NO? *Heart*. 2002; 87(6):507-9.
149. Maeder M, Fehr T, Rickli H, Ammann P. Sepsis-associated myocardial dysfunction: diagnostic and prognostic impact of cardiac troponins and natriuretic peptides. *Chest*. 2006; 129(5):1349-66.
150. Rady MY. B-type natriuretic peptide and sepsis: it is not just the heart. *J Intensive Care Med*. 2007; 22(6):386-8.
151. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41:851-76.
152. Khimji AK, Rockey DC. Endothelin-biology and disease. *Cell Signal*. 2010; 22(11):1615-25.
153. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev*. 2011; 91(1):1-77.
154. Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68(2):195-203.

155. Piechota M, Banach M, Irzmanski R, Barylski M, Piechota-Urbanska M, Kowalski J, *et al.* Plasma endothelin-1 levels in septic patients. *J Intensive Care Med.* 2007; 22(4):232-9.
156. Mitaka C, Hirata Y, Makita K, Nagura T, Tsunoda Y, Amaha K. Endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in septic shock. *Am Heart J.* 1993; 126(2):466-8.
157. Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol.* 2000; 407(1-2):1-15.
158. Treschan TA, Peters J. The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology.* 2006; 105(3):599-612; quiz 39-40.
159. Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest.* 2001; 120(3):989-1002.
160. Vincent JL, Su F. Physiology and pathophysiology of the vasopressinergic system. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2008; 22(2):243-52.
161. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1- receptor physiology. *Crit Care.* 2003; 7(6):427-34.
162. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. *Crit Care.* 2004; 8(1):15-23.
163. Mutlu GM, Factor P. Role of vasopressin in the management of septic shock. *Intensive Care Med.* 2004; 30(7):1276-91.
164. Sharshar T, Blanchard A, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D. Circulating vasopressin levels in septic shock. *Crit Care Med.* 2003; 31(6):1752-8.
165. Sharshar T, Carlier R, Blanchard A, Feydy A, Gray F, Paillard M, *et al.* Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. *Crit Care Med.* 2002; 30(3):497-500.
166. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC, Jr., Seo S, D'Alessandro D, *et al.* Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation.* 1997; 95(5):1122-5.
167. Barrett LK, Singer M, Clapp LH. Vasopressin: mechanisms of action on the vasculature in health and in septic shock. *Crit Care Med.* 2007; 35(1):33-40.
168. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev.* 2000; 21(2):138-67.
169. Bunton DC, Petrie MC, Hillier C, Johnston F, McMurray JJ. The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? *Pharmacol Ther.* 2004; 103(3):179-201.
170. Hay DL, Smith DM. Adrenomedullin receptors: molecular identity and function. *Peptides.* 2001; 22(11):1753-63.
171. Ishimitsu T, Ono H, Minami J, Matsuoka H. Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders. *Pharmacol Ther.* 2006; 111(3):909-27.
172. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 2004; 84(3):903-34.
173. Ueda S, Nishio K, Minamino N, Kubo A, Akai Y, Kangawa K, *et al.* Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(1):132-6.
174. Fowler DE, Yang S, Zhou M, Chaudry IH, Simms HH, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1: their role in the septic response. *J Surg Res.* 2003; 109(2):175-81.
175. Zudaire E, Portal-Nunez S, Cuttitta F. The central role of adrenomedullin in host defense. *J Leukoc Biol.* 2006; 80(2):237-44.
176. Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol.* 2005; 6(6):558-64.
177. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998; 339(5):321-8.
178. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev.* 2006; 27(1):47-72.
179. Dietz JR. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovasc Res.* 2005; 68(1):8-17.
180. Ueda S, Nishio K, Akai Y, Fukushima H, Ueyama T, Kawai Y, *et al.* Prognostic value of increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with septic shock. *Shock.* 2006; 26(2):134-9.
181. Witthaut R, Busch C, Fraunberger P, Walli A, Seidel D, Pilz G, *et al.* Plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are increased in septic shock: impact of interleukin-6 and sepsis-associated left ventricular dysfunction. *Intensive Care Med.* 2003; 29(10):1696-702.
182. Witthaut R. Science review: natriuretic peptides in critical illness. *Crit Care.* 2004; 8(5):342-9.
183. Vollmar AM. The role of atrial natriuretic peptide in the immune system. *Peptides.* 2005; 26(6):1086-94.
184. Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients. *Peptides.* 2005; 26(12):2500-4.
185. Struck J, Tao C, Morgenthaler NG, Bergmann A. Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. *Peptides.* 2004; 25(8):1369-72.

186. Buckley MG, Sagnella GA, Markandu ND, Singer DR, MacGregor GA. Concentrations of N-terminal ProANP in human plasma: evidence for ProANP (1-98) as the circulating form. *Clin Chim Acta*. 1990; 191(1-2):1-14.
187. Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo. *Peptides*. 2005; 26(12):2482-6.
188. Morgenthaler NG, Struck J, Thomas B, Bergmann A. Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem*. 2004; 50(1):234-6.
189. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem*. 2005; 51(10):1823-9.
190. Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. *Clin Chem*. 2006; 52(6):1144-51.
191. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem*. 2006; 52(1):112-9.
192. Vesely DL, Douglass MA, Dietz JR, Gower WR, Jr., McCormick MT, Rodriguez-Paz G, *et al*. Three peptides from the atrial natriuretic factor prohormone amino terminus lower blood pressure and produce diuresis, natriuresis, and/or kaliuresis in humans. *Circulation*. 1994; 90(3):1129-40.
193. Gao X, Brailoiu GC, Brailoiu E, Dun SL, Yang J, Chang JK, *et al*. Copeptin immunoreactivity and calcium mobilisation in hypothalamic neurones of the rat. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20(11):1242-51.
194. Fabbrini MS, Vitale A, Patrono C, Zamaï M, Vaghi F, Caiolfa V, *et al*. Heterologous in vivo processing of human preproendothelin 1 into bioactive peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(20):8939-43.
195. Gumusel B, Chang JK, Hyman A, Lipton H. Adrenotensin: an ADM gene product with the opposite effects of ADM. *Life Sci*. 1995; 57(8):PL87-90.
196. Holwerda DA. A glycopeptide from the posterior lobe of pig pituitaries. I. Isolation and characterization. *Eur J Biochem*. 1972; 28(3):334-9.
197. Weir ML, Honrath U, Flynn TG, Sonnenberg H. Lack of biologic activity or specific binding of amino-terminal pro-ANP segments in the rat. *Regul Pept*. 1994; 53(2):111-22.
198. Huang DT, Angus DC, Kellum JA, Pugh NA, Weissfeld LA, Struck J, *et al*. Midregional proadrenomedullin as a prognostic tool in community-acquired pneumonia. *Chest*. 2009; 136(3):823-31.
199. Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Bergmann A, Muller B. Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium*. 2007; 14(6):345-51.
200. Schuetz P, Stolz D, Mueller B, Morgenthaler NG, Struck J, Mueller C, *et al*. Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. *BMC Infect Dis*. 2008; 8:22.
201. Morgenthaler NG, Muller B, Struck J, Bergmann A, Redl H, Christ-Crain M. Copeptin, a stable peptide of the arginine vasopressin precursor, is elevated in hemorrhagic and septic shock. *Shock*. 2007; 28(2):219-26.
202. Kruger S, Papassotiriou J, Marre R, Richter K, Schumann C, von Baum H, *et al*. Pro-atrial natriuretic peptide and pro-vasopressin to predict severity and prognosis in community-acquired pneumonia: results from the German competence network CAPNETZ. *Intensive Care Med*. 2007; 33(12):2069-78.
203. Morgenthaler NG, Struck J, Christ-Crain M, Bergmann A, Muller B. Pro-atrial natriuretic peptide is a prognostic marker in sepsis, similar to the APACHE II score: an observational study. *Crit Care*. 2005; 9(1):R37-45.
204. Seligman R, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Meisner M, Teixeira PJ. Prognostic value of midregional pro-atrial natriuretic peptide in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 2008; 34(11):2084-91.
205. Roch A. Increased levels of pro-AVP and pro-ADM in septic shock patients: what could it mean? *Intensive Care Med*. 2009; 35(11):1827-9.
206. Balanescu S, Kopp P, Gaskill MB, Morgenthaler NG, Schindler C, Rutishauser J. Correlation of plasma copeptin and vasopressin concentrations in hypo-, iso-, and hyperosmolar States. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(4):1046-52.
207. Jochberger S, Morgenthaler NG, Mayr VD, Luckner G, Wenzel V, Ulmer H, *et al*. Copeptin and arginine vasopressin concentrations in critically ill patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(11):4381-6.
208. Westermann I, Dunser MW, Haas T, Jochberger S, Luckner G, Mayr VD, *et al*. Endogenous vasopressin and copeptin response in multiple trauma patients. *Shock*. 2007; 28(6):644-9.
209. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163(2):316-21.
210. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*. 2005; 353(16):1711-23.
211. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995; 332(20):1351-62.

212. Venkataraman S, Munoz R, Candido C, Witchel SF. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007; 8(4):365-73.
213. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002; 420(6917):853-9.
214. Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med*. 2009; 265(6):663-79.
215. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 117(4):1162-72.
216. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*. 2009; 101(1):36-47.
217. Zanotti S, Kumar A. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002; 11(8):1061-75.
218. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med*. 2000; 26 Suppl 1:S124-8.
219. Scumpia PO, Moldawer LL. Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med*. 2005; 33(12 Suppl):S468-71.
220. Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. *Immunology*. 1992; 76(1):20-3.
221. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000; 181(1):176-80.
222. Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet*. 1994; 343(8899):707-8.
223. Cavaillon JM. "Septic Plasma": an immunosuppressive milieu. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166(11):1417-8.
224. Prins JM, Kuijper EJ, Mevissen ML, Speelman P, van Deventer SJ. Release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 during antibiotic killing of *Escherichia coli* in whole blood: influence of antibiotic class, antibiotic concentration, and presence of septic serum. *Infect Immun*. 1995; 63(6):2236-42.
225. Sfeir T, Saha DC, Astiz M, Rackow EC. Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. *Crit Care Med*. 2001; 29(1):129-33.
226. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, *et al*. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 1995; 181(5):1887-92.
227. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166(11):1475-82.
228. Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, *et al*. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett*. 2004; 95(2):193-8.
229. Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos CA. Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004; 11(1):161-7.
230. Muehlstedt SG, Lyte M, 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(6):443-50.
231. Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E. Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med*. 1996; 128(6):594-600.
232. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*. 2006; 10(5):233.
233. Granowitz EV, Porat R, Mier JW, Orencole SF, Kaplanski G, Lynch EA, *et al*. Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans. *J Immunol*. 1993; 151(3):1637-45.
234. Draisma A, Pickkers P, Bouw MP, van der Hoeven JG. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit Care Med*. 2009; 37(4):1261-7.
235. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991; 88(5):1747-54.
236. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, *et al*. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*. 1995; 85(5):1341-7.
237. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med*. 2008; 14(1-2):64-78.
238. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009; 30(10):475-87.
239. Ogata M, Okamoto K, Kohriyama K, Kawasaki T, Itoh H, Shigematsu A. Role of interleukin-10 on hyporesponsiveness of endotoxin during surgery. *Crit Care Med*. 2000; 28(9):3166-70.

240. West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med.* 2002; 30(1 Supp):S64-S73.
241. Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Rackow EC. Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression. *Chest.* 1993; 104(3):847-53.
242. Barth E, Fischer G, Schneider EM, Wollmeyer J, Georgieff M, Weiss M. Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. *Cytokine.* 2001; 14(5):299-302.
243. Heinzelmann M, Mercer-Jones M, Cheadle WG, Polk HC, Jr. CD14 expression in injured patients correlates with outcome. *Ann Surg.* 1996; 224(1):91-6.
244. Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock.* 2004; 22(5):403-9.
245. Calvano JE, Agnese DM, Um JY, Goshima M, Singhal R, Coyle SM, *et al.* Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance. *Shock.* 2003; 20(5):415-9.
246. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, Asehnoune K, Fitting C, Pinsky MR, *et al.* NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(5):1877-83.
247. McCall CE, Yoza BK. Gene silencing in severe systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175(8):763-7.
248. Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics.* 2011; 6(3):273-83.
249. Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res.* 2011; 90(1):9-17.
250. Wilson AG. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol.* 2008; 79(8 Suppl):1514-9.
251. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature.* 2009; 457(7228):396-404.
252. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(2):94-108.
253. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature.* 2007; 447(7147):972-8.
254. del Fresno C, Garcia-Rio F, Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Fernandez-Ruiz I, Jurado T, *et al.* Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol.* 2009; 182(10):6494-507.
255. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009; 361(16):1570-83.
256. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal.* 2004; 16(2):139-44.
257. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol.* 2005; 78(2):325-37.
258. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature.* 1998; 396(6707):119-22.
259. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407(6805):770-6.
260. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(1):67-71.
261. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, *et al.* Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 2001; 166(11):6952-63.
262. Guisset O, Dilhuydy MS, Thiebaut R, Lefevre J, Camou F, Sarrat A, *et al.* Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 2007; 33(1):148-52.
263. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, *et al.* Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol.* 2002; 168(5):2493-500.
264. Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, Drewry AM, Chang KC, Karl IE, *et al.* Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol.* 2003; 171(2):909-14.
265. Perl M, Chung CS, Ayala A. Apoptosis. *Crit Care Med.* 2005; 33(12 Suppl):S526-9.
266. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *Faseb J.* 2001; 15(6):879-92.
267. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997; 390(6658):350-1.
268. Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, Tinsley KW, Dunne BS, Davis CG, *et al.* Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(11):6724-9.
269. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(11):813-22.

270. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, *et al.* Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997; 91(4):521-30.
271. Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, *et al.* Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol.* 2008; 181(6):4208-18.
272. Ancuta P, Wang J, Gabuzda D. CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 2006; 80(5):1156-64.
273. Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, D'Ambrosio D, Albanesi C, Stoppacciaro A, *et al.* Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest.* 2001; 107(9):1173-81.
274. Pachot A, Cazalis MA, Venet F, Turrel F, Faudot C, Voirin N, *et al.* Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol.* 2008; 180(9):6421-9.
275. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007; 317(5838):666-70.
276. Reddy RC, Chen GH, Newstead MW, Moore T, Zeng X, Tateda K, *et al.* Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10. *Infect Immun.* 2001; 69(3):1394-401.
277. Steinhilber ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol.* 1999; 162(1):392-9.
278. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood.* 2000; 96(1):218-23.
279. Manjuck J, Saha DC, Astiz M, Eales LJ, Rackow EC. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med.* 2000; 135(2):153-60.
280. Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, van den Berg AP, Tulleken JE, Kallenberg CG, *et al.* The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med.* 1999; 55(3):132-41.
281. Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14:301-31.
282. Reith W, Mach B. The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:331-73.
283. Boss JM, Jensen PE. Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15(1):105-11.
284. Venet F, Tissot S, Debard AL, Faudot C, Crampe C, Pachot A, *et al.* Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med.* 2007; 35(8):1910-7.
285. Cheron A, Monneret G, Landelle C, Floccard B, Allaouchiche B. [Low monocytic HLA-DR expression and risk of secondary infection.]. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2010.
286. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schuttler J. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med.* 2002; 30(5):1015-23.
287. Haveman JW, van den Berg AP, van den Berk JM, Mesander G, Slooff MJ, de Leij LH, *et al.* Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake. *Transpl Infect Dis.* 1999; 1(3):146-52.
288. Satoh A, Miura T, Satoh K, Masamune A, Yamagiwa T, Sakai Y, *et al.* Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes as a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis. *Pancreas.* 2002; 25(3):245-50.
289. Harms H, Prass K, Meisel C, Klehmet J, Rogge W, Drenckhahn C, *et al.* Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *PLoS One.* 2008; 3(5):e2158.
290. Lukaszewicz AC, Griénay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, *et al.* Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med.* 2009; 37(10):2746-52.
291. Pachot A, Monneret G, Brion A, Venet F, Bohe J, Bienvenu J, *et al.* Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med.* 2005; 33(1):31-8; discussion 236-7.
292. Wolk K, Kunz S, Crompton NE, Volk HD, Sabat R. Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. *J Biol Chem.* 2003; 278(20):18030-6.

293. Koppelman B, Neeffjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity*. 1997; 7(6):861-71.
294. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, *et al*. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*. 2005; 437(7061):1032-7.
295. Belikova I, Lukaszewicz AC, Faivre V, Damoiseil C, Singer M, Payen D. Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis. *Crit Care Med*. 2007; 35(12):2702-8.
296. Crouser ED. Suppression of monocyte metabolism by septic plasma: revisiting the concept of "blood poisoning". *Crit Care Med*. 2007; 35(12):2856-7.
297. Schwiebert LM, Schleimer RP, Radka SF, Ono SJ. Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone. *Cell Immunol*. 1995; 165(1):12-9.
298. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, *et al*. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169(10):1144-51.
299. Basta PV, Moore TL, Yokota S, Ting JP. A beta-adrenergic agonist modulates DR alpha gene transcription via enhanced cAMP levels in a glioblastoma multiforme line. *J Immunol*. 1989; 142(8):2895-901.
300. Krakauer T, Oppenheim JJ. IL-1 and tumor necrosis factor-alpha each up-regulate both the expression of IFN-gamma receptors and enhance IFN-gamma-induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J Immunol*. 1993; 150(4):1205-11.
301. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, *et al*. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 1991; 174(4):915-24.
302. Piani A, Hossle JP, Birchler T, Siegrist CA, Heumann D, Davies G, *et al*. Expression of MHC class II molecules contributes to lipopolysaccharide responsiveness. *Eur J Immunol*. 2000; 30(11):3140-6.
303. Flohe S, Lendemans S, Selbach C, Waydhas C, Ackermann M, Schade FU, *et al*. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the immune response of circulating monocytes after severe trauma. *Crit Care Med*. 2003; 31(10):2462-9.
304. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, *et al*. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 1997; 3(6):678-81.
305. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, *et al*. GM-CSF to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression: A Double-blind Randomized Placebo-controlled Multicenter Trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009.
306. Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings DP, Gutensohn K, Jung R, *et al*. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2003; 29(4):646-51.
307. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohe J, *et al*. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med*. 2010; 36(11):1859-66.
308. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, *et al*. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006; 32(8):1175-83.
309. Caille V, Chiche JD, Nciri N, Berton C, Gibot S, Boval B, *et al*. Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. *Shock*. 2004; 22(6):521-6.
310. Hynninen M, Pettila V, Takkunen O, Orko R, Jansson SE, Kuusela P, *et al*. Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock*. 2003; 20(1):1-4.
311. Allen ML, Peters MJ, Goldman A, Elliott M, James I, Callard R, *et al*. Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and prolonged stay in pediatric cardiac intensive care. *Crit Care Med*. 2002; 30(5):1140-5.
312. van den Berk JM, Oldenburger RH, van den Berg AP, Klompmaker IJ, Mesander G, van Son WJ, *et al*. Low HLA-DR expression on monocytes as a prognostic marker for bacterial sepsis after liver transplantation. *Transplantation*. 1997; 63(12):1846-8.
313. Richter A, Nebe T, Wendl K, Schuster K, Klaebisch G, Quintel M, *et al*. HLA-DR expression in acute pancreatitis. *Eur J Surg*. 1999; 165(10):947-51.
314. Castelino DJ, McNair P, Kay TW. Lymphocytopenia in a hospital population--what does it signify? *Aust N Z J Med*. 1997; 27(2):170-4.
315. Monserrat J, de Pablo R, Reyes E, Diaz D, Barcenilla H, Zapata MR, *et al*. Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit Care*. 2009; 13(1):R26.

316. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol.* 2005; 174(8):5110-8.
317. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, *et al.* Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock.* 2002; 18(6):487-94.
318. Delogu G, Famularo G, Tellan G, Marandola M, Antonucci A, Signore M, *et al.* Lymphocyte apoptosis, caspase activation and inflammatory response in septic shock. *Infection.* 2008; 36(5):485-7.
319. Schroeder S, Lindemann C, Decker D, Klaschik S, Hering R, Putensen C, *et al.* Increased susceptibility to apoptosis in circulating lymphocytes of critically ill patients. *Langenbecks Arch Surg.* 2001; 386(1):42-6.
320. Rajan G, Sleight JW. Lymphocyte counts and the development of nosocomial sepsis. *Intensive Care Med.* 1997; 23(11):1187.
321. Felmet KA, Hall MW, Clark RS, Jaffe R, Carcillo JA. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol.* 2005; 174(6):3765-72.
322. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, *et al.* Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol.* 2000; 1(6):496-501.
323. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, *et al.* Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(25):14541-6.
324. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, *et al.* Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 1999; 162(7):4148-56.
325. Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets.* 2007; 8(4):493-500.
326. Parrino J, Hotchkiss RS, Bray M. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(2):191-8.
327. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, *et al.* Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am J Surg.* 1999; 178(4):288-92.
328. Roth G, Moser B, Krenn C, Brunner M, Haisjackl M, Almer G, *et al.* Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 308(4):840-6.
329. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock.* 1999; 11(3):153-9.
330. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, *et al.* Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med.* 2003; 31(7):2068-71.
331. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, *et al.* Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med.* 2004; 32(11):2329-31.
332. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, Barraud D, Levy B, Bollaert PE, *et al.* The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit Care.* 2010; 14(1):R19.
333. MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, McKenna AM, Delisle A, Lapchak PH, *et al.* Increased CD4+CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg.* 2006; 244(4):514-23.
334. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly KM, O'Malley KA, Efron PA, McAuliffe PF, *et al.* Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 2006; 177(11):7943-9.
335. Wisnoski N, Chung CS, Chen Y, Huang X, Ayala A. The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock.* 2007; 27(3):251-7.
336. Nascimento DC, Alves-Filho JE, Sonogo F, Fukada SY, Pereira MS, Benjamim C, *et al.* Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2010; 38(8):1718-25.
337. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4(4):330-6.
338. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol.* 2005; 6(4):331-7.
339. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(7):490-500.
340. Cavassani KA, Carson WF, Moreira AP, Wen H, Schaller MA, Ishii M, *et al.* The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood.* 2010; 115(22):4403-11.

341. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009; 30(5):636-45.
342. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(7):523-32.
343. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, *et al*. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009; 35(4):678-86.
344. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Weinstein JS, Wynn JL, Winfield RD, *et al*. Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. *Blood*. 2007; 110(10):3673-81.
345. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchorzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol*. 2006; 177(10):7155-63.
346. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, *et al*. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol*. 2006; 177(9):6540-7.
347. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(5):336-47.
348. Baxter AG, Hodgkin PD. Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(6):439-46.
349. Chambers CA. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol*. 2001; 22(4):217-23.
350. Venet F, Bohe J, Debard AL, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G. Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med*. 2005; 33(12):2836-40.
351. Hinrichs C, Kotsch K, Buchwald S, Habicher M, Saak N, Gerlach H, *et al*. Perioperative gene expression analysis for prediction of postoperative sepsis. *Clin Chem*. 2010; 56(4):613-22.
352. De AK, Kodys KM, Pellegrini J, Yeh B, Furse RK, Bankey P, *et al*. Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression. *Clin Immunol*. 2000; 96(1):52-66.
353. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:515-48.
354. Bandyopadhyay G, De A, Laudanski K, Li F, Lentz C, Bankey P, *et al*. Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. *Crit Care Med*. 2007; 35(3):794-801.
355. Laudanski K, Miller-Graziano C, Xiao W, Mindrinos MN, Richards DR, De A, *et al*. Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(42):15564-9.
356. Sun Y, Brown NK, Ruddy MJ, Miller ML, Lee Y, Wang Y, *et al*. B and T lymphocyte attenuator tempers early infection immunity. *J Immunol*. 2009; 183(3):1946-51.
357. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26:677-704.
358. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992; 11(11):3887-95.
359. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, *et al*. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000; 192(7):1027-34.
360. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999; 5(12):1365-9.
361. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, *et al*. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001; 2(3):261-8.
362. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, *et al*. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med*. 2001; 193(7):839-46.
363. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol*. 2007; 19(7):813-24.
364. Zhang X, Schwartz JC, Guo X, Bhatia S, Cao E, Lorenz M, *et al*. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity*. 2004; 20(3):337-47.
365. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:29-53.
366. Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, Pastor S, Truneh A, Nunes JA, *et al*. PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int Immunol*. 2010; 22(8):651-60.
367. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, Iwai H, Otsuki N, Jin H, *et al*. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 307(3):672-7.

368. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996; 8(5):765-72.
369. Vibhakar R, Juan G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Finger LR. Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Exp Cell Res.* 1997; 232(1):25-8.
370. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol.* 2004; 173(2):945-54.
371. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010; 236:219-42.
372. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, *et al.* Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol.* 2002; 169(10):5538-45.
373. Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, Minato N, *et al.* Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett.* 2002; 84(1):57-62.
374. Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(9):5336-41.
375. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, *et al.* Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol.* 2003; 170(3):1257-66.
376. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, *et al.* Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol.* 2003; 33(10):2706-16.
377. Mazanet MM, Hughes CC. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol.* 2002; 169(7):3581-8.
378. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007; 8(3):239-45.
379. Messal N, Serriari NE, Pastor S, Nunes JA, Olive D. PD-L2 is expressed on activated human T cells and regulates their function. *Mol Immunol.* 2011; 48(15-16):2214-9.
380. Rodig N, Ryan T, Allen JA, Pang H, Grabie N, Chernova T, *et al.* Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 2003; 33(11):3117-26.
381. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D, *et al.* Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol.* 2003; 170(2):711-8.
382. Pentcheva-Hoang T, Chen L, Pardoll DM, Allison JP. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(45):17765-70.
383. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(24):13866-71.
384. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, *et al.* CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(21):9543-53.
385. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 2009; 229(1):114-25.
386. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.* 2004; 574(1-3):37-41.
387. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, *et al.* PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 2002; 32(3):634-43.
388. Saunders PA, Hendrycks VR, Lidinsky WA, Woods ML. PD-L2:PD-1 involvement in T cell proliferation, cytokine production, and integrin-mediated adhesion. *Eur J Immunol.* 2005; 35(12):3561-9.
389. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, *et al.* Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol.* 2009; 10(11):1185-92.
390. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, *et al.* Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science.* 2001; 291(5502):319-22.
391. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999; 11(2):141-51.
392. Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1217:45-59.
393. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, *et al.* Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med.* 2006; 203(4):883-95.

394. Bedke T, Pretsch L, Karakhanova S, Enk AH, Mahnke K. Endothelial cells augment the suppressive function of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells: involvement of programmed death-1 and IL-10. *J Immunol.* 2010; 184(10):5562-70.
395. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2009; 206(13):3015-29.
396. Shin H, Wherry EJ. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19(4):408-15.
397. Khaitan A, Unutmaz D. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011; 8(1):4-11.
398. Watanabe T, Bertoletti A, Tanoto TA. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *J Viral Hepat.* 2010; 17(7):453-8.
399. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006; 12(10):1198-202.
400. Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, *et al.* PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8⁺ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood.* 2007; 109(11):4671-8.
401. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006; 443(7109):350-4.
402. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006; 439(7077):682-7.
403. Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, *et al.* Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol.* 2007; 81(8):4215-25.
404. Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol.* 2008; 45(4):963-70.
405. Fiscaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, *et al.* Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2010; 138(2):682-93, 93 e1-4.
406. Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol.* 2007; 81(17):9249-58.
407. Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M, *et al.* Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology.* 2008; 134(7):1927-37, 37 e1-2.
408. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, *et al.* PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol.* 2006; 80(22):11398-403.
409. Penna A, Pilli M, Zerbin A, Orlandini A, Mezzadri S, Sacchelli L, *et al.* Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2007; 45(3):588-601.
410. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, *et al.* PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med.* 2006; 203(10):2281-92.
411. Urbani S, Amadei B, Tola D, Pedrazzi G, Sacchelli L, Cavallo MC, *et al.* Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: effect of viremia levels and antiviral treatment. *J Hepatol.* 2008; 48(4):548-58.
412. Chen L, Zhang Z, Chen W, Li Y, Shi M, Zhang J, *et al.* B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol.* 2007; 178(10):6634-41.
413. Jeong HY, Lee YJ, Seo SK, Lee SW, Park SJ, Lee JN, *et al.* Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(3):755-64.
414. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, *et al.* Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. *Nat Med.* 2010; 16(4):452-9.
415. Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, Reyes VE. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol.* 2006; 176(5):3000-9.
416. Beswick EJ, Pinchuk IV, Das S, Powell DW, Reyes VE. Expression of the programmed death ligand 1, B7-H1, on gastric epithelial cells after *Helicobacter pylori* exposure promotes development of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells. *Infect Immun.* 2007; 75(9):4334-41.

417. Wu YY, Lin CW, Cheng KS, Lin C, Wang YM, Lin IT, *et al.* Increased programmed death-ligand-1 expression in human gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol.* 2010; 161(3):551-9.
418. Brown KE, Freeman GJ, Wherry EJ, Sharpe AH. Role of PD-1 in regulating acute infections. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22(3):397-401.
419. Crawford A, Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21(2):179-86.
420. Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ, Jin B, Xu B, Zou ZS, *et al.* Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology.* 2008; 134(7):1938-49, 49 e1-3.
421. Kasprovicz V, Schulze Zur Wiesch J, Kuntzen T, Nolan BE, Longworth S, Berical A, *et al.* High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *J Virol.* 2008; 82(6):3154-60.
422. Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, *et al.* Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog.* 2009; 5(2):e1000313.
423. Zhang Y, Zhou Y, Lou J, Li J, Bo L, Zhu K, *et al.* PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit Care.* 2010; 14(6):R220.
424. Brahmamdam P, Inoue S, Unsinger J, Chang KC, McDunn JE, Hotchkiss RS. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J Leukoc Biol.* 2010; 88(2):233-40.
425. Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, *et al.* PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(15):6303-8.
426. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2001; 2(4):293-9.
427. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54(4):307-14.
428. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002; 8(8):793-800.
429. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, *et al.* B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63(19):6501-5.
430. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, *et al.* Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 2005; 65(3):1089-96.
431. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(9):3360-5.
432. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, *et al.* Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006; 66(7):3381-5.
433. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, *et al.* Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer.* 2010; 116(7):1757-66.
434. Matsuzaki J, Gnjjatic S, Mhawech-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Tsuji T, *et al.* Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(17):7875-80.
435. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med.* 2003; 9(5):562-7.
436. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(19):12293-7.
437. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol.* 2010; 28(19):3167-75.
438. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med.* 2009; 15(5):496-7.
439. Burgmann H, Hiesmayr JM, Savey A, Bauer P, Metnitz B, Metnitz PG. Impact of nosocomial infections on clinical outcome and resource consumption in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2010; 36(9):1597-601.
440. Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet.* 2003; 361(9374):2068-77.

441. Luyt CE, Combes A, Deback C, Aubriot-Lorton MH, Nieszkowska A, Trouillet JL, *et al.* Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175(9):935-42.
442. Bruynseels P, Jorens PG, Demey HE, Goossens H, Pattyn SR, Elseviers MM, *et al.* Herpes simplex virus in the respiratory tract of critical care patients: a prospective study. *Lancet.* 2003; 362(9395):1536-41.
443. Linssen CF, Jacobs JA, Stelma FF, van Mook WN, Terporten P, Vink C, *et al.* Herpes simplex virus load in bronchoalveolar lavage fluid is related to poor outcome in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2008; 34(12):2202-9.
444. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, *et al.* Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA.* 2008; 300(4):413-22.
445. Kalil AC, Florescu DF. Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 2009; 37(8):2350-8.
446. Hartemink KJ, Paul MA, Spijkstra JJ, Girbes AR, Polderman KH. Immunoparalysis as a cause for invasive aspergillosis? *Intensive Care Med.* 2003; 29(11):2068-71.
447. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9(4):499-511.
448. Monneret G, Venet F, Kullberg BJ, Netea MG. ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Med Mycol.* 2011; 49 Suppl 1:S17-23.
449. Das I, Nightingale P, Patel M, Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int J Infect Dis.* 2011; 15(11):e759-63.
450. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL. Candida bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med.* 2011; 39(4):665-70.
451. Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, Seta N, Dombret MC, Crestani B, *et al.* Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150(3):710-6.
452. Marie C, Losser MR, Fitting C, Kermarrec N, Payen D, Cavaillon JM. Cytokines and soluble cytokine receptors in pleural effusions from septic and nonseptic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156(5):1515-22.
453. Cavaillon JM, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res.* 2006; 12(3):151-70.
454. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* 2008; 36(1):296-327.
455. Marshall JC. Principles of source control in the early management of sepsis. *Curr Infect Dis Rep.* 2010; 12(5):345-53.
456. Ferrer R, Artigas A, Suarez D, Palencia E, Levy MM, Arenzana A, *et al.* Effectiveness of treatments for severe sepsis: a prospective, multicenter, observational study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180(9):861-6.
457. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006; 34(6):1589-96.
458. Funk DJ, Kumar A. Antimicrobial therapy for life-threatening infections: speed is life. *Crit Care Clin.* 2011; 27(1):53-76.
459. Butt MA, Coulson AK, Hull JH, Ho TB. Bloodstream infection: Early treatment strategies in sepsis. *BMJ.* 2008; 336(7643):521.
460. Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, Pines JM, Massone R, Furia FF, *et al.* Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Crit Care Med.* 2010; 38(4):1045-53.
461. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, *et al.* Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest.* 2009; 136(5):1237-48.
462. Scaglione F. Appropriate use of antimicrobials: the peculiarity of septic patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34 Suppl 4:S52-4.
463. Sharma S, Kumar A. Antimicrobial management of sepsis and septic shock. *Clin Chest Med.* 2008; 29(4):677-87, ix.
464. Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Crit Care Med.* 2009; 37(3):840-51; quiz 59.
465. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, *et al.* Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001; 345(19):1368-77.
466. Demertzis LM, Kollef MH. The resuscitation package in sepsis. *Curr Infect Dis Rep.* 2010; 12(5):368-73.

467. Dellinger RP. Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med*. 2003; 31(3):946-55.
468. Monnet X, Teboul JL. Early fluid resuscitation. *Curr Infect Dis Rep*. 2010; 12(5):354-60.
469. Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; 3:CD000567.
470. Zanotti Cavazzoni SL, Dellinger RP. Hemodynamic optimization of sepsis-induced tissue hypoperfusion. *Crit Care*. 2006; 10 Suppl 3:S2.
471. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000; 342(18):1334-49.
472. Martin GS, Bernard GR. Airway and lung in sepsis. *Intensive Care Med*. 2001; 27 Suppl 1:S63-79.
473. Rady MY. Bench-to-bedside review: Resuscitation in the emergency department. *Crit Care*. 2005; 9(2):170-6.
474. Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med*. 2006; 355(16):1699-713.
475. Wiener RS, Wiener DC, Larson RJ. Benefits and risks of tight glucose control in critically ill adults: a meta-analysis. *JAMA*. 2008; 300(8):933-44.
476. Egi M, Finfer S, Bellomo R. Glycemic control in the ICU. *Chest*. 2011; 140(1):212-20.
477. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med*. 2004; 351(2):159-69.
478. Ronco C, Kellum JA, Bellomo R, House AA. Potential interventions in sepsis-related acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3(2):531-44.
479. Venkataraman R, Subramanian S, Kellum JA. Clinical review: extracorporeal blood purification in severe sepsis. *Crit Care*. 2003; 7(2):139-45.
480. Rabindranath K, Adams J, Macleod AM, Muirhead N. Intermittent versus continuous renal replacement therapy for acute renal failure in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007; (3):CD003773.
481. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, de Cal M, Polanco N, Corradi V, *et al*. Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care*. 2007; 11(2):R47.
482. Davies B, Cohen J. Endotoxin removal devices for the treatment of sepsis and septic shock. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(1):65-71.
483. Cavaillon JM. Polymyxin B for endotoxin removal in sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(6):426-7.
484. Joannidis M. Continuous renal replacement therapy in sepsis and multisystem organ failure. *Semin Dial*. 2009; 22(2):160-4.
485. Tumlin J, Wali R, Williams W, Murray P, Tolwani AJ, Vinnikova AK, *et al*. Efficacy and safety of renal tubule cell therapy for acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19(5):1034-40.
486. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*. 1999; 341(8):586-92.
487. Zeerleder S, Hack CE, Willemin WA. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest*. 2005; 128(4):2864-75.
488. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003; 124(3 Suppl):26S-32S.
489. Sarangi PP, Lee HW, Kim M. Activated protein C action in inflammation. *Br J Haematol*. 2010; 148(6):817-33.
490. Toltl LJ, Swystun LL, Pepler L, Liaw PC. Protective effects of activated protein C in sepsis. *Thromb Haemost*. 2008; 100(4):582-92.
491. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, *et al*. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001; 344(10):699-709.
492. Laterre PF. Clinical trials in severe sepsis with drotrecogin alfa (activated). *Crit Care*. 2007; 11 Suppl 5:S5.
493. Marti-Carvajal A, Salanti G, Cardona AF. Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; (1):CD004388.
494. Toussaint S, Gerlach H. Activated protein C for sepsis. *N Engl J Med*. 2009; 361(27):2646-52.
495. Finfer S, Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, *et al*. Design, conduct, analysis and reporting of a multi-national placebo-controlled trial of activated protein C for persistent septic shock. *Intensive Care Med*. 2008; 34(11):1935-47.
496. Dellinger RP. Steroid therapy of septic shock: the decision is in the eye of the beholder. *Crit Care Med*. 2008; 36(6):1987-9.
497. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, Heyland DK, King D, Lansang MA, *et al*. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med*. 1995; 23(8):1430-9.
498. Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, *et al*. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med*. 2008; 36(6):1937-49.
499. Patel GP, Balk RA. Systemic Steroids in Severe Sepsis and Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med*. *In press*.
500. Saito T, Takanashi M, Gallagher E, Fuse A, Suzaki S, Inagaki O, *et al*. Corticosteroid effect on early beta-adrenergic down-regulation during circulatory shock: hemodynamic study and beta-adrenergic receptor assay. *Intensive Care Med*. 1995; 21(3):204-10.

501. d'Emmanuele di Villa Bianca R, Lippolis L, Autore G, Popolo A, Marzocco S, Sorrentino L, *et al.* Dexamethasone improves vascular hyporeactivity induced by LPS in vivo by modulating ATP-sensitive potassium channels activity. *Br J Pharmacol.* 2003; 140(1):91-6.
502. Oppert M, Schindler R, Husung C, Offermann K, Graf KJ, Boenisch O, *et al.* Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock. *Crit Care Med.* 2005; 33(11):2457-64.
503. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, *et al.* Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *Jama.* 2002; 288(7):862-71.
504. Roquilly A, Mahe PJ, Seguin P, Guitton C, Floch H, Tellier AC, *et al.* Hydrocortisone therapy for patients with multiple trauma: the randomized controlled HYPOLYTE study. *JAMA.* 2011; 305(12):1201-9.
505. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, *et al.* Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med.* 2008; 358(2):111-24.
506. Sprung CL, Brezis M, Goodman S, Weiss YG. Corticosteroid therapy for patients in septic shock: some progress in a difficult decision. *Crit Care Med.* 2011; 39(3):571-4.
507. Suffredini AF, Munford RS. Novel therapies for septic shock over the past 4 decades. *JAMA.* 2011; 306(2):194-9.
508. Pugin J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp.* 2007; 280:21-7; discussion 7-36, 160-4.
509. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol.* 1995; 58(4):373-81.
510. Mock CN, Dries DJ, Jurkovich GJ, Maier RV. Assessment of two clinical trials: interferon-gamma therapy in severe injury. *Shock.* 1996; 5(4):235-40.
511. Heinzel FP. The role of IFN-gamma in the pathology of experimental endotoxemia. *J Immunol.* 1990; 145(9):2920-4.
512. Nakos G, Malamou-Mitsi VD, Lachana A, Karassavoglou A, Kitsioulis E, Agnandi N, *et al.* Immunoparalysis in patients with severe trauma and the effect of inhaled interferon-gamma. *Crit Care Med.* 2002; 30(7):1488-94.
513. Hubel K, Dale DC, Liles WC. Therapeutic use of cytokines to modulate phagocyte function for the treatment of infectious diseases: current status of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma. *J Infect Dis.* 2002; 185(10):1490-501.
514. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(7):533-44.
515. Flohe S, Borgermann J, Dominguez FE, Majetschak M, Lim L, Kreuzfelder E, *et al.* Influence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on whole blood endotoxin responsiveness following trauma, cardiopulmonary bypass, and severe sepsis. *Shock.* 1999; 12(1):17-24.
516. Orozco H, Arch J, Medina-Franco H, Pantoja JP, Gonzalez QH, Vilatoba M, *et al.* Molgramostim (GM-CSF) associated with antibiotic treatment in nontraumatic abdominal sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Surg.* 2006; 141(2):150-3; discussion 4.
517. Rosenbloom AJ, Linden PK, Dorrance A, Penkosky N, Cohen-Melamed MH, Pinsky MR. Effect of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor therapy on leukocyte function and clearance of serious infection in nonneutropenic patients. *Chest.* 2005; 127(6):2139-50.
518. Myrianthefs PM, Karabatsos EG, Karatzas SP, Boutzouka EG, Venetsanou KF, Evagelopoulou PL, *et al.* Safety and efficacy of molgramostim as an adjunctive therapy in critically ill patients with severe sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003; 35(3):175-9.
519. Bo L, Wang F, Zhu J, Li J, Deng X. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit Care.* 2011; 15(1):R58.
520. Trapnell BC. A novel biomarker-guided immunomodulatory approach for the therapy of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180(7):585-6.
521. Schefold JC. Immunostimulation using granulocyte- and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care.* 2011; 15(2):136.
522. Marshall JC. The effects of granulocyte colony-stimulating factor in preclinical models of infection and acute inflammation. *Shock.* 2005; 24 Suppl 1:120-9.
523. Schneider C, von Aulock S, Zedler S, Schinkel C, Hartung T, Faist E. Perioperative recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (Filgrastim) treatment prevents immunoinflammatory dysfunction associated with major surgery. *Ann Surg.* 2004; 239(1):75-81.
524. Nelson S, Belknap SM, Carlson RW, Dale D, DeBoisblanc B, Farkas S, *et al.* A randomized controlled trial of filgrastim as an adjunct to antibiotics for treatment of hospitalized patients with community-acquired pneumonia. CAP Study Group. *J Infect Dis.* 1998; 178(4):1075-80.

525. Root RK, Lodato RF, Patrick W, Cade JF, Fotheringham N, Milwee S, *et al.* Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. *Crit Care Med.* 2003; 31(2):367-73.
526. Azoulay E, Delclaux C. Is there a place for granulocyte colony-stimulating factor in non-neutropenic critically ill patients? *Intensive Care Med.* 2004; 30(1):10-7.
527. Weiss M, Voglic S, Harms-Schirra B, Lorenz I, Lasch B, Dumon K, *et al.* Effects of exogenous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim, rhG-CSF) on neutrophils of critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome depend on endogenous G-CSF plasma concentrations on admission. *Intensive Care Med.* 2003; 29(6):904-14.
528. Opal SM. New perspectives on immunomodulatory therapy for bacteraemia and sepsis. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36S2:S70-S3.
529. Rizza SA, Badley AD. HIV protease inhibitors impact on apoptosis. *Med Chem.* 2008; 4(1):75-9.
530. Ayala A, Wesche-Soldato DE, Perl M, Lomas-Neira JL, Swan R, Chung CS. Blockade of apoptosis as a rational therapeutic strategy for the treatment of sepsis. *Novartis Found Symp.* 2007; 280:37-49; discussion -52, 160-4.
531. Bommhardt U, Chang KC, Swanson PE, Wagner TH, Tinsley KW, Karl IE, *et al.* Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2004; 172(12):7583-91.
532. Kalechman Y, Gafter U, Gal R, Rushkin G, Yan D, Albeck M, *et al.* Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *J Immunol.* 2002; 169(1):384-92.
533. Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, *et al.* Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect Immun.* 2010; 78(4):1582-92.
534. Ohkura N, Hamaguchi M, Sakaguchi S. FOXP3⁺ regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents. *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32(3):158-66.
535. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, *et al.* CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science.* 2008; 322(5899):271-5.
536. Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF- β , and CTLA4. *J Immunol.* 2003; 171(10):5012-7.
537. Cameron F, Whiteside G, Perry C. Ipilimumab: first global approval. *Drugs.* 2011; 71(8):1093-104.
538. Bakacs T, Mehrishi JN, Moss RW. Ipilimumab (Yervoy) and the TGN1412 catastrophe. *Immunobiology.* *In press.*
539. Hotchkiss RS, Opal S. Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med.* 2010; 363(1):87-9.
540. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev.* 2010; 234(1):45-54.
541. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care.* 2009; 13(4):R119.
542. Flohe SB, Agrawal H, Schmitz D, Gertz M, Flohe S, Schade FU. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(3):473-81.
543. Wysocka M, Montaner LJ, Karp CL. Flt3 ligand treatment reverses endotoxin tolerance-related immunoparalysis. *J Immunol.* 2005; 174(11):7398-402.
544. Masten BJ, Olson GK, Kusewitt DF, Lipscomb MF. Flt3 ligand preferentially increases the number of functionally active myeloid dendritic cells in the lungs of mice. *J Immunol.* 2004; 172(7):4077-83.
545. Toliver-Kinsky TE, Cui W, Murphey ED, Lin C, Sherwood ER. Enhancement of dendritic cell production by fms-like tyrosine kinase-3 ligand increases the resistance of mice to a burn wound infection. *J Immunol.* 2005; 174(1):404-10.
546. Bradley LM, Haynes L, Swain SL. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol.* 2005; 26(3):172-6.
547. Alpdogan O, van den Brink MR. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. *Trends Immunol.* 2005; 26(1):56-64.
548. Unsinger J MM, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, McDonough JS, Tschopp J, Ferguson TA, McDunn JE, Morre M, Hildeman DA, Caldwell CC, Hotchkiss RS. IL-7 Promotes T Cell Viability, Trafficking, and Functionality and Improves Survival in Sepsis. *J Immunol.* 2010; 184(7):3768-79.
549. Sportes C, Gress RE, Mackall CL. Perspective on potential clinical applications of recombinant human interleukin-7. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1182:28-38.
550. Carrol ED. Comment on "IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis" and comment on "IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis". *J Immunol.* 2010; 15(185):789-90.
551. Freeman BD, Natanson C. Anti-inflammatory therapies in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs.* 2000; 9(7):1651-63.

552. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, *et al.* The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 1997; 336(13):912-8.
553. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, *et al.* Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA.* 2009; 301(22):2362-75.
554. Marshall JC. Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(5):391-405.
555. van der Poll T. Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1(3):165-74.
556. Pildal J, Gotzsche PC. Polyclonal immunoglobulin for treatment of bacterial sepsis: a systematic review. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(1):38-46.
557. Kreyman KG, de Heer G, Nierhaus A, Kluge S. Use of polyclonal immunoglobulins as adjunctive therapy for sepsis or septic shock. *Crit Care Med.* 2007; 35(12):2677-85.
558. Laupland KB, Kirkpatrick AW, Delaney A. Polyclonal intravenous immunoglobulin for the treatment of severe sepsis and septic shock in critically ill adults: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2007; 35(12):2686-92.
559. Werdan K. Mirror, mirror on the wall, which is the fairest meta-analysis of all? *Crit Care Med.* 2007; 35(12):2852-4.
560. Neugebauer EA. To use or not to use? Polyclonal intravenous immunoglobulins for the treatment of sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2007; 35(12):2855-6.
561. Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med.* 2001; 29(7 Suppl):S121-5.
562. Marshall JC. Clinical trials of mediator-directed therapy in sepsis: what have we learned? *Intensive Care Med.* 2000; 26 Suppl 1:S75-83.
563. Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, *et al.* Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004; 32(1):21-30.
564. Zeni F, Freeman B, Natanson C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med.* 1997; 25(7):1095-100.
565. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med.* 1999; 25(6):556-66.
566. Vincent JL, Sun Q, Dubois MJ. Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin Infect Dis.* 2002; 34(8):1084-93.
567. Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, *et al.* Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med.* 1997; 25(7):1115-24.
568. Cross AS, Opal SM. A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy? *Ann Intern Med.* 2003; 138(6):502-5.
569. Opal SM, Patrozou E. Translational research in the development of novel sepsis therapeutics: logical deductive reasoning or mission impossible? *Crit Care Med.* 2009; 37(1 Suppl):S10-5.
570. Munford RS. Murine responses to endotoxin: another dirty little secret? *J Infect Dis.* 2010; 201(2):175-7.
571. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(1):137-43.
572. Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med.* 2009; 37(1 Suppl):S30-7.
573. Warren HS, Fitting C, Hoff E, Adib-Conquy M, Beasley-Topliffe L, Tesini B, *et al.* Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. *J Infect Dis.* 2010; 201(2):223-32.
574. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med.* 2004; 32(5 Suppl):S219-22.
575. Marshall JC, Deitch E, Moldawer LL, Opal S, Redl H, van der Poll T. Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? *Shock.* 2005; 24 Suppl 1:1-6.
576. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun.* 1996; 64(11):4733-8.
577. Delano MJ, Thayer T, Gabrilovich S, Kelly-Scumpia KM, Winfield RD, Scumpia PO, *et al.* Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J Immunol.* 2011; 186(1):195-202.
578. Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood.* 2005; 105(9):3588-95.
579. Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal SM, Masur H. Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit Care Med.* 2008; 36(3):964-6.

580. Marshall JC. The staging of sepsis: understanding heterogeneity in treatment efficacy. *Crit Care*. 2005; 9(6):626-8.
581. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, *et al*. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166(9):1197-205.
582. Marshall JC. Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *J Leukoc Biol*. 2008; 83(3):471-82.
583. Howell MD, Talmor D, Schuetz P, Hunziker S, Jones AE, Shapiro NI. Proof of principle: The predisposition, infection, response, organ failure sepsis staging system. *Crit Care Med*. 2011; 39(2):322-7.
584. Levy MM, Macias WL, Vincent JL, Russell JA, Silva E, Trzaskoma B, *et al*. Early changes in organ function predict eventual survival in severe sepsis. *Crit Care Med*. 2005; 33(10):2194-201.
585. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*. 1993; 270(24):2957-63.
586. Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, *et al*. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*. 1998; 26(11):1793-800.
587. Turner KL, Moore LJ, Todd SR, Sucher JF, Jones SA, McKinley BA, *et al*. Identification of cardiac dysfunction in sepsis with B-type natriuretic Peptide. *J Am Coll Surg*. 2011; 213(1):139-46.
588. Mehta NJ, Khan IA, Gupta V, Jani K, Gowda RM, Smith PR. Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock. *Int J Cardiol*. 2004; 95(1):13-7.
589. ver Elst KM, Spapen HD, Nguyen DN, Garbar C, Huyghens LP, Gorus FK. Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. *Clin Chem*. 2000; 46(5):650-7.
590. Rosjo H, Varpula M, Hagve TA, Karlsson S, Ruokonen E, Pettila V, *et al*. Circulating high sensitivity troponin T in severe sepsis and septic shock: distribution, associated factors, and relation to outcome. *Intensive Care Med*. 2011; 37(1):77-85.
591. Favory R, Neviere R. Significance and interpretation of elevated troponin in septic patients. *Crit Care*. 2006; 10(4):224.
592. McLean AS, Huang SJ, Salter M. Bench-to-bedside review: the value of cardiac biomarkers in the intensive care patient. *Crit Care*. 2008; 12(3):215.
593. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Stolz D, Muller C, Bingisser R, Harbarth S, *et al*. Pro-adrenomedullin to predict severity and outcome in community-acquired pneumonia [ISRCTN04176397]. *Crit Care*. 2006; 10(3):R96.
594. Masia M, Papassotiropoulos J, Morgenthaler NG, Hernandez I, Shum C, Gutierrez F. Midregional pro-A-type natriuretic peptide and carboxy-terminal pro-vasopressin may predict prognosis in community-acquired pneumonia. *Clin Chem*. 2007; 53(12):2193-201.
595. Muller B, Suess E, Schuetz P, Muller C, Bingisser R, Bergmann A, *et al*. Circulating levels of pro-atrial natriuretic peptide in lower respiratory tract infections. *J Intern Med*. 2006; 260(6):568-76.
596. Seligman R, Papassotiropoulos J, Morgenthaler NG, Meisner M, Teixeira PJ. Copeptin, a novel prognostic biomarker in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care*. 2008; 12(1):R11.
597. Muller B, Morgenthaler N, Stolz D, Schuetz P, Muller C, Bingisser R, *et al*. Circulating levels of copeptin, a novel biomarker, in lower respiratory tract infections. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37(2):145-52.
598. Prat C, Lacombe A, Dominguez J, Papassotiropoulos J, Morgenthaler NG, Andreo F, *et al*. Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia. *J Infect*. 2007; 55(5):400-7.
599. Kruger S, Ewig S, Giersdorf S, Hartmann O, Suttrop N, Welte T. Cardiovascular and inflammatory biomarkers to predict short- and long-term survival in community-acquired pneumonia: Results from the German Competence Network, CAPNETZ. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(11):1426-34.
600. Vazquez M, Jockers K, Christ-Crain M, Zimmerli W, Muller B, Schuetz P. MR-pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) predicts short- and long-term outcomes in respiratory tract infections: A prospective validation study. *Int J Cardiol*.
601. Schuetz P, Wolbers M, Christ-Crain M, Thomann R, Falconnier C, Widmer I, *et al*. Prohormones for prediction of adverse medical outcome in community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections. *Crit Care*. 2010; 14(3):R106.
602. Schuetz P, Christ-Crain M, Zimmerli W, Mueller B. Repeated measurements of endothelin-1 precursor peptides predict the outcome in community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med*. 2011; 37(6):970-80.
603. Kruger S, Ewig S, Kunde J, Hartmann O, Suttrop N, Welte T. Pro-atrial natriuretic peptide and pro-vasopressin for predicting short-term and long-term survival in community-acquired pneumonia: results from the German Competence Network CAPNETZ. *Thorax*. 2010; 65(3):208-14.
604. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Muller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care*. 2005; 9(6):R816-24.

605. Khan SQ, O'Brien RJ, Struck J, Quinn P, Morgenthaler N, Squire I, *et al.* Prognostic value of midregional pro-adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction: the LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide) study. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49(14):1525-32.
606. Khan SQ, Dhillon OS, O'Brien RJ, Struck J, Quinn PA, Morgenthaler NG, *et al.* C-terminal pro-vasopressin (copeptin) as a novel and prognostic marker in acute myocardial infarction: Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide (LAMP) study. *Circulation.* 2007; 115(16):2103-10.
607. Khan SQ, Dhillon O, Struck J, Quinn P, Morgenthaler NG, Squire IB, *et al.* C-terminal pro-endothelin-1 offers additional prognostic information in patients after acute myocardial infarction: Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide (LAMP) Study. *Am Heart J.* 2007; 154(4):736-42.
608. Khan SQ, Dhillon O, Kelly D, Squire IB, Struck J, Quinn P, *et al.* Plasma N-terminal B-Type natriuretic peptide as an indicator of long-term survival after acute myocardial infarction: comparison with plasma midregional pro-atrial natriuretic peptide: the LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide) study. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51(19):1857-64.
609. Temmesfeld-Wollbruck B, Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin and endothelial barrier function. *Thromb Haemost.* 2007; 98(5):944-51.
610. Genel F, Atlihan F, Ozsu E, Ozbek E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J Infect.* 2010; 60(3):224-8.
611. Kampalath B, Cleveland RP, Chang CC, Kass L. Monocytes with altered phenotypes in posttrauma patients. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127(12):1580-5.
612. Huschak G, Zur Nieden K, Stuttmann R, Riemann D. Changes in monocytic expression of aminopeptidase N/CD13 after major trauma. *Clin Exp Immunol.* 2003; 134(3):491-6.
613. Polk HC, Jr., George CD, Wellhausen SR, Cost K, Davidson PR, Regan MP, *et al.* A systematic study of host defense processes in badly injured patients. *Ann Surg.* 1986; 204(3):282-99.
614. Giannoudis PV, Smith RM, Windsor AC, Bellamy MC, Guillou PJ. Monocyte human leukocyte antigen-DR expression correlates with intrapulmonary shunting after major trauma. *Am J Surg.* 1999; 177(6):454-9.
615. Giannoudis PV, Smith RM, Perry SL, Windsor AJ, Dickson RA, Bellamy MC. Immediate IL-10 expression following major orthopaedic trauma: relationship to anti-inflammatory response and subsequent development of sepsis. *Intensive Care Med.* 2000; 26(8):1076-81.
616. Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Rebmann V, Ferencik S, Majetschak M, Schmid EN, *et al.* HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Ann Surg.* 1999; 229(2):246-54.
617. Walsh DS, Thavichaiarn P, Pattanapanyasat K, Siritongtaworn P, Kongcharoen P, Tongtawe P, *et al.* Characterization of circulating monocytes expressing HLA-DR or CD71 and related soluble factors for 2 weeks after severe, non-thermal injury. *J Surg Res.* 2005; 129(2):221-30.
618. Monneret G, Venet F, Meisel C, Schefold JC. Assessment of monocytic HLA-DR expression in ICU patients: analytical issues for multicentric flow cytometry studies. *Crit Care.* 2010; 14(4):432.
619. Docke WD, Hoflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, *et al.* Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem.* 2005; 51(12):2341-7.
620. Grimaldi D, Louis S, Pene F, Sirgo G, Rousseau C, Claessens YE, *et al.* Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2011; 37(9):1438-46.
621. Riccardi F, Della Porta MG, Rovati B, Casazza A, Radolovich D, De Amici M, *et al.* Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cells in patients with severe sepsis. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011; 80(1):14-21.
622. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J Immunol.* 2008; 180(10):6941-6.
623. Roquilly A, Gautreau L, Segain JP, de Coppet P, Sebillé V, Jacqueline C, *et al.* CpG-ODN and MPLA prevent mortality in a murine model of post-hemorrhage-Staphylococcus aureus pneumonia. *PLoS One.* 2010; 5(10):e13228.
624. Limaye AP, Boeckh M. CMV in critically ill patients: pathogen or bystander? *Rev Med Virol.* 2010; 20(6):372-9.
625. Cook CH, Trgovcich J. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent hosts: a decade of progress and remaining challenges. *Antiviral Res.* 2011; 90(3):151-9.
626. Heininger A, Haeberle H, Fischer I, Beck R, Riessen R, Rohde F, *et al.* Cytomegalovirus reactivation and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2011; 15(2):R77.
627. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rodel J, Menge K, Reinhart K, *et al.* The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care.* 2011; 15(4):R183.
628. MacLean LD, Meakins JL, Taguchi K, Duignan JP, Dhillon KS, Gordon J. Host resistance in sepsis and trauma. *Ann Surg.* 1975; 182(3):207-17.

629. Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, Kelly R, Rode H, Gordon J, *et al.* Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg.* 1977; 186(3):241-50.
630. Zhang Y, Li J, Lou J, Zhou Y, Bo L, Zhu J, *et al.* Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care.* 2011; 15(1):R70.
631. Roger PM, Hyvernat H, Breittmayer JP, Dunais B, Dellamonica J, Bernardin G, *et al.* Enhanced T-cell apoptosis in human septic shock is associated with alteration of the costimulatory pathway. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(6):575-84.
632. Inoue S, Bo L, Bian J, Unsinger J, Chang K, Hotchkiss RS. Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis. *Shock.* 2011; 36(1):38-44.
633. Pachot A, Monneret G, Voirin N, Leissner P, Venet F, Bohe J, *et al.* Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin Immunol.* 2005; 114(1):61-9.
634. Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, *et al.* Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(3):523-35.
635. Brahmamdam P, Watanabe E, Unsinger J, Chang KC, Schierding W, Hoekzema AS, *et al.* Targeted delivery of siRNA to cell death proteins in sepsis. *Shock.* 2009; 32(2):131-9.
636. Marsik C, Halama T, Cardona F, Wlassits W, Mayr F, Pleiner J, *et al.* Regulation of Fas (APO-1, CD95) and Fas ligand expression in leukocytes during systemic inflammation in humans. *Shock.* 2003; 20(6):493-6.
637. Weber SU, Schewe JC, Lehmann LE, Muller S, Book M, Klaschik S, *et al.* Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. *Crit Care.* 2008; 12(5):R128.
638. Bilbault P, Lavaux T, Lahlou A, Uring-Lambert B, Gaub MP, Ratomponirina C, *et al.* Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care. *Intensive Care Med.* 2004; 30(3):408-15.
639. White M, Mahon V, Grealy R, Doherty DG, Stordeur P, Kelleher DP, *et al.* Post-operative infection and sepsis in humans is associated with deficient gene expression of gammac cytokines and their apoptosis mediators. *Crit Care.* 2011; 15(3):R158.
640. Chung CS, Venet F, Chen Y, Jones LN, Wilson DC, Ayala CA, *et al.* Deficiency of Bid protein reduces sepsis-induced apoptosis and inflammation, while improving septic survival. *Shock.* 2010; 34(2):150-61.
641. Chang KC, Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, *et al.* Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. *FASEB J.* 2007; 21(3):708-19.
642. group BDw. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69(3):89-95.
643. Dalton WS, Friend SH. Cancer biomarkers--an invitation to the table. *Science.* 2006; 312(5777):1165-8.
644. Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation.* 2007; 115(8):949-52.
645. Levy MM. Preface biomarkers in critical illness. *Crit Care Clin.* 2011; 27(2):xiii-xv.
646. Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard AL, Gutowski MC, Bienvenu J, *et al.* Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem.* 2002; 48(9):1589-92.
647. Fumeaux T, Pugin J. Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis? *Intensive Care Med.* 2006; 32(8):1106-8.
648. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA.* 1995; 273(2):117-23.
649. Glickman SW, Cairns CB, Otero RM, Woods CW, Tsalik EL, Langley RJ, *et al.* Disease progression in hemodynamically stable patients presenting to the emergency department with sepsis. *Acad Emerg Med.* 2010; 17(4):383-90.
650. Agarwal R, Schwartz DN. Procalcitonin to guide duration of antimicrobial therapy in intensive care units: a systematic review. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(4):379-87.
651. Savva A, Raftogiannis M, Baziaka F, Routsis C, Antonopoulou A, Koutoukas P, *et al.* Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) for assessment of disease severity in ventilator-associated pneumonia and sepsis. *J Infect.* 2011; 63(5):344-50.
652. Koch A, Voigt S, Kruschinski C, Sanson E, Duckers H, Horn A, *et al.* Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor is stably elevated during the first week of treatment in the intensive care unit and predicts mortality in critically ill patients. *Crit Care.* 2011; 15(1):R63.
653. Eugen-Olsen J. suPAR - a future risk marker in bacteremia. *J Intern Med.* 2011; 270(1):29-31.
654. Wittenhagen P, Kronborg G, Weis N, Nielsen H, Obel N, Pedersen SS, *et al.* The plasma level of soluble urokinase receptor is elevated in patients with *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia and predicts mortality. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10(5):409-15.
655. Huttunen R, Syrjanen J, Vuento R, Hurme M, Huhtala H, Laine J, *et al.* Plasma level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a predictor of disease severity and case fatality in patients with bacteraemia: a prospective cohort study. *J Intern Med.* 2011; 270(1):32-40.

656. Wagner C, Deppisch R, Deneffle B, Hug F, Andrassy K, Hansch GM. Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the FCgamma receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock*. 2003; 19(1):5-12.
657. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130(5):654-61.
658. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, *et al*. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med*. 2000; 26(7):883-92.
659. Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Augustatou K, *et al*. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine*. 2006; 36(5-6):283-90.
660. Groselj-Grenc M, Ihan A, Pavcnik-Arnol M, Kopitar AN, Gmeiner-Stopar T, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children. *Intensive Care Med*. 2009; 35(11):1950-8.
661. Cid J, Aguinaco R, Sanchez R, Garcia-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2010; 60(5):313-9.
662. Gamez-Diaz LY, Enriquez LE, Matute JD, Velasquez S, Gomez ID, Toro F, *et al*. Diagnostic Accuracy of HMGB-1, sTREM-1, and CD64 as Markers of Sepsis in Patients Recently Admitted to the Emergency Department. *Acad Emerg Med*. 2011; 18(8):807-15.
663. van der Meer W, van Dun L, Gunnewiek JK, Roemer B, Scott CS. Simultaneous determination of membrane CD64 and HLA-DR expression by blood neutrophils and monocytes using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser. *J Immunol Methods*. 2006.
664. Christie JD. Microarrays. *Crit Care Med*. 2005; 33(12 Suppl):S449-52.
665. Tang BM, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RC. The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176(7):676-84.
666. Tang BM, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RC. Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. *Crit Care Med*. 2009; 37(3):882-8.
667. Karvunidis T, Mares J, Thongboonkerd V, Matejovic M. Recent progress of proteomics in critical illness. *Shock*. 2009; 31(6):545-52.
668. Pugin J. Profiling genes in the ICU: are we there yet? *Intensive Care Med*. 2008; 34(8):1357-9.
669. Hoehn GT, Suffredini AF. Proteomics. *Crit Care Med*. 2005; 33(12 Suppl):S444-8.
670. LaRosa SP, Opal SM. Biomarkers: the future. *Crit Care Clin*. 2011; 27(2):407-19.
671. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis*. 2003; 36(Suppl 1):S11-23.
672. Reinhart K, Hartog CS. Biomarkers as a guide for antimicrobial therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36 Suppl 2:S17-21.
673. Jensen JU, Hein L, Lundgren B, Bestle MH, Mohr TT, Andersen MH, *et al*. Procalcitonin-guided interventions against infections to increase early appropriate antibiotics and improve survival in the intensive care unit: a randomized trial. *Crit Care Med*. 2011; 39(9):2048-58.
674. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985; 13(10):818-29.
675. Knaus WA. APACHE 1978-2001: the development of a quality assurance system based on prognosis: milestones and personal reflections. *Arch Surg*. 2002; 137(1):37-41.
676. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, *et al*. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med*. 1997; 336(4):243-50.
677. Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, Birkhahn R, Otero R, Osborn TM, *et al*. A prospective, multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. *Crit Care Med*. 2009; 37(1):96-104.
678. Haase M, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Mertens PR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. *Curr Opin Hematol*. *In press*.
679. Cruz DN, de Cal M, Garzotto F, Perazella MA, Lentini P, Corradi V, *et al*. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early biomarker for acute kidney injury in an adult ICU population. *Intensive Care Med*. 2010; 36(3):444-51.
680. Martensson J, Bell M, Oldner A, Xu S, Venge P, Martling CR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in adult septic patients with and without acute kidney injury. *Intensive Care Med*. 2010; 36(8):1333-40.
681. Constantin JM, Futier E, Perbet S, Roszyk L, Lautrette A, Gillart T, *et al*. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: a prospective study. *J Crit Care*. 2010; 25(1):176 e1-6.
682. Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, Birkhahn R, Otero R, Osborn TM, *et al*. The diagnostic accuracy of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the prediction of acute kidney injury in emergency department patients with suspected sepsis. *Ann Emerg Med*. 2010; 56(1):52-9 e1.

683. Wong HR, Cvijanovich N, Lin R, Allen GL, Thomas NJ, Willson DF, *et al.* Identification of pediatric septic shock subclasses based on genome-wide expression profiling. *BMC Med.* 2009; 7:34.
684. Wong HR, Wheeler DS, Tegtmeier K, Poynter SE, Kaplan JM, Chima RS, *et al.* Toward a clinically feasible gene expression-based subclassification strategy for septic shock: proof of concept. *Crit Care Med.* 2010; 38(10):1955-61.
685. Pene F, Courtine E, Cariou A, Mira JP. Toward theragnostics. *Crit Care Med.* 2009; 37(1 Suppl):S50-8.
686. Skrupky LP, Kerby PW, Hotchkiss RS. Advances in the Management of Sepsis and the Understanding of Key Immunologic Defects. *Anesthesiology.* *In press.*
687. Group IC. Treatment of neonatal sepsis with intravenous immune globulin. *N Engl J Med.* 2011; 365(13):1201-11.
688. Lambert ML SC, Savey A, Palomar M, Hiesmayr M, Morales I, Agodi A, Frank U, Mertens K SM, Wolkewitz M. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to european intensive-care units: a cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11:30-8.
689. Bahrami S, Pelinka L, Khadem A, Maitzen S, Hawa G, van Griensven M, *et al.* Circulating NT-proCNP predicts sepsis in multiple-traumatized patients without traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 2010; 38(1):161-6.
690. Johnson SB, Lissauer M, Bochicchio GV, Moore R, Cross AS, Scalea TM. Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis. *Ann Surg.* 2007; 245(4):611-21.
691. Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, Cook DJ, Rubenfeld G, Foster D, *et al.* Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med.* 2003; 31(5):1560-7.
692. Kofoed K, Andersen O, Kronborg G, Tvede M, Petersen J, Eugen-Olsen J, *et al.* Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Crit Care.* 2007; 11(2):R38.
693. Chan T, Gu F. Early diagnosis of sepsis using serum biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011; 11(5):487-96.
694. Wang TJ. Multiple biomarkers for predicting cardiovascular events: lessons learned. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55(19):2092-5.
695. Boeck L, Eggimann P, Smyrniotis N, Pargger H, Thakkar N, Siegemund M, *et al.* Midregional pro-atrial natriuretic peptide and procalcitonin improve survival prediction in VAP. *Eur Respir J.* 2011; 37(3):595-603.
696. Dhainaut JF, Shorr AF, Macias WL, Kollef MJ, Levi M, Reinhart K, *et al.* Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Crit Care Med.* 2005; 33(2):341-8.
697. Guertler C, Wirz B, Christ-Crain M, Zimmerli W, Mueller B, Schuetz P. Inflammatory responses predict long-term mortality risk in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J.* 2011; 37(6):1439-46.
698. Schuetz P, Chiappa V, Briel M, Greenwald JL. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions: a systematic review of randomized controlled trials and recommendations for clinical algorithms. *Arch Intern Med.* 2011; 171(15):1322-31.
699. Kopterides P, Siempos, II, Tsangaris I, Tsantes A, Armaganidis A. Procalcitonin-guided algorithms of antibiotic therapy in the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care Med.* 2010; 38(11):2229-41.
700. Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med.* 2009; 37(7):2290-8.

ANNEXES

Innovative therapeutic strategies for restoring lymphocyte functions in septic patients

Fanny Turel, Caroline Guignant, Fabienne Venet, Alain Lepape, Guillaume Monneret.
Inflammation & Allergy – Drug targets, 2008; 7: 181-186

Inflammation & Allergy - Drug Targets, 2008, 7, 181-186

181

Innovative Therapeutic Strategies for Restoring Lymphocyte Functions in Septic Patients

Fanny Turrel¹, Caroline Guignant², Fabienne Venet³, Alain Lepape⁴ and Guillaume Monneret^{*2}

¹Joint Unit Hospices Civils de Lyon – bioMérieux, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

²Hospices Civils de Lyon - Immunology Department, Hôpital E. Herriot, Lyon, France

³Division of Surgical Research, Rhode Island Hospital/Brown University, Providence, RI, USA

⁴Hospices Civils de Lyon - Intensive Care Unit, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Lyon, France

Abstract: Septic syndromes still remain a major but largely under-recognized healthcare problem worldwide accounting for thousands of deaths every year. Despite numerous clinical trials, therapies have failed to mitigate the devastating effects of these conditions. It is now agreed that the initial hypotheses for sepsis pathophysiology have been misconstrued. Sepsis deeply perturbs immune homeostasis by concomitantly inducing a strong inflammatory response and a major anti-inflammatory process, acting as a negative feedback. Several lines of evidences indicate that this inhibitory response secondly may be deleterious in patients who survived initial resuscitation, as it may be directly responsible for worsening outcome by decreasing resistance to secondary nosocomial infections. In this context, while the majority of clinical and basic science conducted so far has focused on innate immune cell depressed functions (especially monocytes), the contribution of T lymphocyte anergy has been somewhat ignored. This review focuses on lymphocyte dysfunctions described so far in patients and on potential new therapeutic strategies aimed at restoring a functional lymphocytic response after sepsis.

Keywords: Sepsis, septic shock, lymphocyte, immunosuppression, FOXP3, apoptosis, IL-7.

EPIDEMIOLOGY AND NEW HYPOTHESES IN PATHOGENESIS

Sepsis remains one of the most challenging problems in critical care medicine, as it still constitutes the leading cause of death in non-coronary ICUs. Sepsis syndrome (*i.e.* sepsis, severe sepsis, septic shock) has been shown to result in more than 210,000 deaths per year in the United States (60 000 deaths per year in France) despite major advances in supportive care [1-3]. More worrisome, its incidence has been continuously rising over the past two decades [4], (75% increase in the incidence rate of severe sepsis) which may be partly explained by the improved care of the elderly and by associated co-morbidities in patients (*e.g.*, cancer, diabetes...) [3]. Therefore, as the population further ages, the incidence of sepsis is projected to increase significantly in the forthcoming years, leading, for example, to over a million cases of severe sepsis in 2020 in the USA alone [1]. Accordingly, a recent study has showed that the hospitalization rate for severe sepsis has almost doubled from 1993 to 2003 and that the population-based mortality has risen by two-third during the same period of time [5]. Indeed, as meanwhile mortality has only modestly decreased despite advances in supportive therapy, the continuously increased incidence of sepsis explains a constant rise in population-based mortality rate.

As most of the therapies have failed to mitigate the deleterious effects of the syndrome, it is now proposed that the initial hypotheses for sepsis pathophysiology have been

inadequately addressed. More specifically, the postulate that death after sepsis was only due to an overwhelming pro-inflammatory response has been challenged by the failure of numerous clinical trials testing anti-inflammatory treatments [6,7]. Rather, it is now agreed that both inflammatory and anti-inflammatory responses occur concomitantly after septic shock [8-13].

Initially after an infection, patients develop a tremendous systemic inflammatory response normally designated to trigger immune response against pathogens. In some cases, if overwhelming, this response may lead to refractory arterial hypotension, shock and multiple organ dysfunctions. This initial inflammatory response is immediately followed by an anti-inflammatory process, acting as a negative feedback [8,14,15], which, if not appropriately balanced, may become deleterious as well, as nearly all immune functions are believed to be compromised. Accordingly, it is now hypothesized that a persisting immunosuppressive state may contribute not only to patients' inability to kill invading microorganisms and increased risk of contracting nosocomial infections but also to their death [8,14-17]. In line, clinical studies have shown that the spontaneous recovery of a functional pro-inflammatory response after septic shock is associated with survival [7,18-21]. Consequently, therapies aimed at restoring immune functions now offer a new perspective for a better care of septic patients [10-12].

Although the mechanistic and molecular bases for sepsis-induced immunosuppression have not yet been entirely established, the main features of the condition have already been described, including alterations of both innate and adaptive immunity [8,11,15]. As the correction of innate immune disorders, mainly characterized by deactivated monocyte func-

*Address correspondence to this author at the Flow Cytometry Unit, Immunology Laboratory, Hôpital E. Herriot, 5, Place d'Arsonval, 69437 Lyon, Cedex 03, France; Tel: (33) 4 72 11 97 58; Fax: (33) 4 72 11 97 53; E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

tions, has been recently reviewed in this Journal [22], the present review will focus on lymphocyte dysfunctions, including the role of increased apoptosis, and their possible treatments.

LYMPHOCYTE ALTERATIONS DURING SEPSIS

Lymphopenia and Defective Lymphocyte Proliferation

Based on their ability to interact with cells of both the innate and adaptive immune responses, the different lymphocyte subpopulations possess a key role in orchestrating the body's response against invading pathogens. A marked decrease in the number of circulating lymphocytes has been observed in patients after sepsis and severe trauma [23-27]. The extent of this lymphopenia, likely due to increased apoptosis (see below), has been correlated with the development of nosocomial infections in those patients [25]. Besides a decrease in their number, the remaining circulating lymphocytes have also been described to present a major state of anergy. This has been known for long and was illustrated by the observation of the loss of delayed-type hypersensitivity reaction to recall skin test antigens in patients. Most importantly, this state of lymphocyte anergy has been shown to be associated with mortality and the development of secondary infections in septic patients [28-30]. More recently, similar observations of a lowered lymphocyte proliferation in response to antigens or mitogens have been performed in patients presenting other forms of severe injuries (major surgery, severe burn or trauma) [31-33]. Importantly, in these patients also, it has been observed that the severity of this anergy correlated with poor outcome, increased occurrence of infectious complications and the development of subsequent multiorgan failure [23,34-42].

Phenotypic Alterations: Induction of Inhibitory Co-Receptors Expression

During the phase of immunosuppression, circulating T lymphocytes are characterized by the overexpression of inhibitory co-receptors. For example, it has recently been observed that anergic T cells from trauma patients expressed a specialized profile of inhibitory co-repressors, including increased PD-1, CD47 and CTLA4 cell-surface expressions [41,43,44]. Moreover, this inhibitory phenotype could be associated with a decrease in the expression of co-activator receptors such as CD28 [34] or CD3 [26,45], which may amplify lymphocyte incapacity to respond to a given antigen. The role of CTLA4 in controlling T cell activation and its therapeutic relevance have been implemented in a recent clinical trial for various human cancers treatment [46]. Recently, Huang *et al.* observed a marked increase in PD-1 expression in monocytes and lymphocytes from septic patients blood and in mice after cecal ligation and puncture (CLP) and that PD-1 knockout mice presented with decreased mortality after CLP [47]. This suggests a major role for PD-1 in sepsis mortality and morbidity [47]. Others studies demonstrated that blockade PD-1:PD-L pathway with specific antibody or small interfering RNA (siRNA) in gastric epithelial cells prevented T regulatory cells (Treg) induction highlighting that PD-L1 may play a role in the generation of Treg and persistent infection [48,49].

Functional Alterations: Decreased Th1/Th2 Responses

A decrease in both Th1 and Th2 cytokine production has been observed in patients after sepsis or severe trauma [33,34,38,50]. The measurements of mRNA of both Th1 and Th2 transcription factors by qRT-PCR provided similar in-

formations by showing marked decreased expressions of Tbet and GATA-3 [51]. Interestingly, in those patients, FOXP3 mRNA expression (specific transcription factor for CD4+ Treg cells – see next paragraph) was not affected, supporting the idea that regulatory functions are maintained during sepsis, while effector responses are severely down-regulated [27].

Regulatory T Cell Populations

One characteristic alteration in T lymphocyte subpopulations in patients after severe injury, is the increased percentage of circulating cells with regulatory properties. In septic shock, the initial observation of an increased percentage of circulating CD4+CD25+ Treg was made by Monneret *et al.* (2003) [52]. In a subsequent study, the same authors reported that this relative increase was indeed due to a decrease in CD4+CD25- circulating T lymphocytes number (Treg counterparts) and not actually to a change in Treg absolute cell count, suggesting a better resistance of these cells to the apoptotic mechanisms occurring after severe injury [27]. Similar observations were made in trauma patients [53] and in mice after polymicrobial septic challenge and stroke [54-57]. Treg possesses potent regulatory properties playing an essential role in the control of both adaptive and innate immune responses [58]. They are mainly characterized by the expression of a specific transcriptional factor called forkhead box transcription factor, Foxp3 [59,60]. Recently, Foxp3 expression has been correlated with the regulation of development and function of CD4+CD25+ Treg [59,61]. This correlation was confirmed in CLP model, underlying an increase in functionally active Treg cells in septic mice although not demonstrating a deleterious role [54]. Scumpia *et al.* demonstrated that administration of agonistic anti-GITR treatment (known to block Treg functions [62]) in CLP mice before surgery, improved T-cell proliferation, cytokine responses, leading to an improvement in survival [45]. It is also believed that Treg can participate in both monocyte and neutrophil apoptosis upon LPS challenge [63, 64]. With that said, the definitive causative relationship between changes in their number or regulatory properties and patient outcome after trauma/sepsis is not established yet. In conclusion, it should be kept in mind that regulatory functions are preserved or enhanced in sepsis while effectors are shut-down. The consequences of those unbalanced lymphocyte responses deserve to be further investigated.

Other regulatory lymphocytes, including specific $\gamma\delta$ T and NKT cells subsets, have been proposed to play a role in the development of immune dysfunctions after severe injury [65-67]. Additional informations in patients are now needed to reinforce these preliminary observations.

Increased Lymphocyte Apoptosis

A major increase in apoptotic processes is also supposed to play an important role in sepsis-induced immune dysfunctions by leading to severe depletion of T and B lymphocytes and therefore compromising both innate and adaptive immunity. Two apoptotic pathways are activated during sepsis: the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway. The putative role of endoplasmic reticulum or stress-induced pathway is not well-established yet. Briefly, the extrinsic pathway involves death receptors belonging to the TNF- α receptor superfamily and having an

intracellular death domain. After activation, the latter recruits an adaptor protein called Fas-associated death domain (FADD) that in turn recruits pro-caspase-8 to the "death-inducing signal complex" (DISC) leading to its activation. This subsequently activates other caspases, such as caspase-3, -6, -7 or -8. Then, active caspase-3 cleaves inhibitors of caspase activated DNase, leading to DNA fragmentation. This DNA cleavage in the nucleus is responsible for death of the cell [9,68]. Initiation of the intrinsic pathway is regulated by the interaction of various pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, which control mitochondrial ion permeability and function. When the external mitochondrial membrane permeability increases, cytochrome C is released to the cytosol, leading to the formation of the apoptosome complex (cytochrome c, Smac/Diablo, apaf-1) that activates caspase-9, which in turn activates caspase-3 [68,69].

Autopsy studies by Hotchkiss *et al.* have disclosed a profound, progressive, apoptosis-induced loss of lymphocytes in the spleen, blood and gut-associated lymphoid tissue of adults who had died of sepsis [70-72]. This loss was especially important because it occurred during life-threatening infectious process, while clonal expansion of these cells might have been expected [8]. Similar studies in pediatric and neonate patients have confirmed this profound apoptosis-induced loss of CD4 T cells and B cells [25,73]. Accordingly, Le Tulzo *et al.* observed a marked increase in circulating lymphocytes apoptosis from septic shock patients in comparison with critically ill patients without sepsis and healthy volunteers. This was associated with a profound and persistent lymphopenia and with poor outcome [74].

Overall, apoptotic processes are extensively activated after sepsis and may play a central role in immune dysfunctions and in patients' altered capacity to clear microorganisms. Importantly, the magnitude of apoptosis has been shown to correlate with severity and to predict fatal outcome in patients. Its prevention by various approaches has improved survival in experimental models of sepsis, therefore pointing toward innovative therapeutic strategies for treating sepsis-induced immune dysfunctions in patients [9].

THERAPEUTIC OPTIONS FOR TREATING LYMPHOCYTE ANERGY IN SEPTIC PATIENTS

Based on lymphocyte alterations described in this review, three main therapeutic strategies can be emphasized: 1/ the restoration of effector lymphocyte count and/or functions; 2/ the blockade of inhibitory signals; 3/ the cure of apoptosis (Table 1).

Table 1. Therapeutic Strategies to Restore Lymphocyte Functions and Counteract Apoptosis

Target	Candidate Drugs
Restoration of lymphocyte count and proliferation	IL-7 / Flt3-L / IL-15
Blockade of inhibiting pathways - receptors / ligand systems - regulatory lineages	GITR-L, anti-CTLA-4, anti-PD1 Foxp3, Galectin-10 siRNA
Blockade of apoptosis	Caspase inhibitors; Over expression of Bcl-2; Inhibition of Fas/FasL signaling; Protease inhibitors

Restoration of Effector Lymphocyte Count/Functions

Restoring T cell function and fighting lymphopenia may represent a worthwhile therapeutic strategy in sepsis. For this purpose, the stimulation of bone marrow lymphocyte production by using recombinant growth factors represents a novel therapeutic approach in sepsis.

Interleukin-(IL)7 and IL-15 are two essential cytokines in T lymphocyte development, survival, expansion and maturation in humans. Peschon *et al.* showed a severely impaired B- and T-cell development in IL-7 or IL-7R deficient mice and in mice treated with neutralizing anti-IL-7 antibodies [75]. Similarly, Puel and coworkers observed that a defect in the IL-7R results in a severe combined immunodeficiency syndrome (SCID) and a complete lack of T cells in mice [76]. Importantly, phase I clinical trials in cancer and HIV infected patients have shown that T cell expansion can be achieved at doses that are well tolerated [77,78]. On the other hand, IL-15 is a pleiotropic cytokine having various roles in both innate and adaptive immunity, especially in the development of natural killer (NK) cells and CD8+ lymphocytes. Kennedy *et al.* demonstrated in IL-15-deficient mice that the administration of IL-15 was associated with an increase in CD8+ memory T cell population in the spleen and the lymph nodes [79]. As IL-15 is supposed to play a key role in viral infections, phase I clinical trial (IL-15 DNA as an adjunctive booster) has been first designed into an experimental HIV vaccine (www.clinicaltrials.gov/NCT00115960). Experimental works also showed that IL-15 may restore CD8 functions during tumor immunotherapy [77]. Taken together, those results indicate putative use in sepsis.

Another potential treatment would be to use Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand (Flt3L) based on the effects of this cell growth factor on lymphoid and myeloid progenitors differentiation [80]. Flt3L is a type I membrane protein expressed on multiple cells including lymphoid cells [81,82] is known to promote the proliferation of dendritic cells (DC), NK, and B and T lymphocytes [83,84]. Ceredig *et al.* demonstrated that, in addition to the expected DC increase (since DC express high levels of Flt3L receptor), mice treated with Flt3L presented with a strong induction of lymphoid progenitors proliferation as well [80]. In a burned mice model, Flt3L treatment expanded NK cell and DC populations in the spleen and both of the CD4+ and CD8+ T-cell subsets [85,86]. Additionally, Flt3L may improve expansion of the antigen-specific T-cell population subsequently inducing an increased IFN- γ and IL-12 production upon bacterial challenge [87].

Suppression of Inhibitor Signaling / Suppressive Functions

The inhibition of lymphocyte suppressive functions would represent another innovative therapeutic strategy. This can be achieved by blocking genes involved in this process, using siRNA or agonistic/antagonistic antibodies administration. In line, the use of ligands of co-activator receptors for effector T lymphocytes may have beneficial effects. As an illustrative example, recent results by Scumpia *et al.* have shown that anti-GITR agonistic antibodies were able to restore lymphocyte proliferation, prevent CD3 down modulation, decrease bacteremia and increase survival in a mice model of sepsis [45]. Similarly, the use of anti-CTLA-4 an-

tibodies has been shown to abrogate the suppressive effect of Treg *in vitro* and *in vivo* in auto-immune diseases [88,89]. A phase I clinical study using anti-PD-1 human monoclonal antibody (MDX-1106) is also in progress ([www.clinicaltrials.gov / NCT00441337](http://www.clinicaltrials.gov/NCT00441337)). This antibody blocks the activation of PD-1 by its ligands PD-L1 and PD-L2, resulting in the activation of T-cells and cell-mediated immune responses against tumor cells or pathogens.

Another approach should be kept in mind. Selective extracorporeal intervention in sepsis (immunoabsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a) has been demonstrated to be effective in reducing secondary monocyte deactivation. Although the authors did not focus on lymphocytes in their study, we may expect similar results in preventing lymphocyte deactivation [90].

The development of more specific targeting methods such as small interfering RNA (siRNA) should provide more reliable tools to modulate specific T cell subset in sepsis-induced immunosuppression. RNA interference using synthetic sequences has quickly emerged as a powerful method to reduce gene expression both *in vitro* and *in vivo* [91]. siRNA therapy has already been tested in phase I and II human clinical trials and appears to be safe and well tolerated ([www.clinicaltrials.gov / NCT00257647](http://www.clinicaltrials.gov/NCT00257647); [www.clinicaltrials.gov / NCT00395057](http://www.clinicaltrials.gov/NCT00395057)). In addition, the effect of gene silencing with siRNA is transient, avoiding long-term complications of gene knockout. This technique has been used by Kubach and colleagues to highlight the role of a new protein, galectin-10 a member of the lectin family, in human Treg cell functions [92]. The authors observed not only a restoration of the proliferative capacity of human Treg cells, but also an abbreviation of their suppressive function after galectin-10 siRNA administration, therefore resulting in an increased proliferation of co-cultured CD4+ T cells [92]. Moreover, the inhibition of galectin-10 synthesis partially restored IFN- γ and TNF- α production of Treg cells themselves, underlying a central role for galectin-10 in the human Treg cells functions.

Cure of Apoptosis

Numerous studies in animal models of sepsis and using a variety of strategies to inhibit apoptotic pathways in lymphocytes, including caspase inhibitors (z-VAD-fmk, Q-Vd-Oph), siRNA administration (targeting Fas, caspases or Bim) and CD95 inhibition suggest that blocking programmed cell death has a beneficial effect on survival after sepsis [9,68,91,93,94].

Beside inhibiting apoptotic pathways, an alternative strategy would be to amplify anti-apoptotic signals. Gene therapy represents one strategy that can be used to reduce lymphocyte apoptosis. Indeed, it has been shown that mice over-expressing Bcl-2 are protected against T cell apoptosis and that their survival upon CLP is improved. Moreover, the transfer of T cells from Bcl-2 over-expressing mice into wild type septic mice also improved survival. Furthermore, in 2006, Hotchkiss *et al.* demonstrated the feasibility of a cell-specific delivery of Bcl-2-like compounds to prevent sepsis-induced apoptosis [94]. They used TAT peptides (TAT-BH4 and TAT-Bcl-xL) that derived from HIV-1 TAT protein and promoted peptides entry into cells [95]. More recently, McDunn *et al.* designed an Akt-activating peptide: TAT-TCL-1, that derived from the Akt-binding domain of the

endogenous Akt coactivator, TCL-1, and prolonged anti-apoptotic Akt activity [96]. Akt is a serine-threonine protein kinase that inactivates numerous proapoptotic molecules after its activation by cell-stimulatory signals (such as growth factors, cytokines, T cell activation). Both approaches using TAT peptides improved survival in sepsis [97]. That said, so far no therapeutic strategy has been sufficiently developed to reach clinical use.

In contrast, HIV protease inhibitors, which activity is partly mediated through anti-apoptotic effects (anti-proteases have partial anti-caspase properties), offer a promising perspective. Administration of ritonavir improved survival in a murine model of sepsis, even when given after the onset of the disease [97]. A phase I trial is currently underway investigating in healthy volunteers, the effects of these drugs in boosting the immune response ([www.clinicaltrials.gov / NCT00346619](http://www.clinicaltrials.gov/NCT00346619)). Of note, drugs aimed at blocking apoptosis may be used as adjunctive agents in association with molecules restoring lymphocyte functions.

CONCLUSION

Sepsis-induced immunosuppression is characterized by the occurrence of severe lymphopenia, increased lymphocyte apoptosis and suppression of T cell functions. These disorders likely contribute to patients' inability to correctly clear primary infections, to the development of nosocomial infections and to an increased mortality. It is now hypothesized that long-term survival after sepsis will not be profoundly influenced unless we start to focus on the delayed immunosuppressive state. For this purpose, molecules that are able to restore T cell functions or to counteract apoptosis, may represent innovative therapeutic strategies to fight this hitherto deadly disease.

REFERENCES

- [1] Angus, D.C.; Linde-Zwirble, W.T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M.R. *Crit. Care Med.*, **2001**, *29*, 1303.
- [2] Martin, G.S.; Mannino, D.M.; Eaton, S.; Moss, M. *N. Engl. J. Med.*, **2003**, *348*, 1546.
- [3] Brun-Buisson, C.; Meshaka, P.; Pinton, P.; Vallet, B. *Intens. Care Med.*, **2004**, *30*, 580.
- [4] Angus, D.C.; Wax, R.S. *Crit. Care Med.*, **2001**, *29*, S109.
- [5] Dombrovskiy, V.Y.; Martin, A.A.; Sunderram, J.; Paz, H.L. *Crit. Care Med.*, **2007**, *35*, 1244.
- [6] Zeni, F.; Freeman, B.; Natanson, C. *Crit. Care Med.*, **1997**, *25*, 1095.
- [7] Remick, D.G. *Am. J. Pathol.*, **2007**, *170*, 1435.
- [8] Hotchkiss, R.S.; Karl, I.E. *N. Engl. J. Med.*, **2003**, *348*, 138.
- [9] Hotchkiss, R.S.; Nicholson, D.W. *Nat. Rev. Immunol.*, **2006**, *6*, 813.
- [10] Pugin, J. *Novartis Found. Symp.*, **2007**, *280*, 21.
- [11] Monneret, G.; Venet, F.; Pachot, A.; Lepape, A. *Mol. Med.*, **2008**, *14*, 64.
- [12] Schefold, J.C.; Hasper, D.; Volk, H.D.; Reinke, P. *Med. Hypotheses*, **2008** [Epub ahead of print].
- [13] Wang, T.S.; Deng, J.C. *J. Mol. Med.*, **2008** [Epub ahead of print].
- [14] Annane, D.; Bellissant, E.; Cavaillon, J.M. *Lancet*, **2005**, *365*, 63.
- [15] Munford, R.S.; Pugin, J. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2001**, *163*, 316.
- [16] Asadullah, K.; Woiciechowsky, C.; Docke, W.D.; Egerer, K.; Kox, W.J.; Vogel, S.; Sterry, W.; Volk, H.D. *Eur. J. Emerg. Med.*, **1995**, *2*, 184.
- [17] Muehlstedt, S.G.; Lyte, M.; Rodriguez, J.L. *Shock*, **2002**, *17*, 443.
- [18] Monneret, G.; Lepape, A.; Voirin, N.; Bohé, J.; Venet, F.; Debard, A.L.; Thizy, H.; Bienvenu, J.; Gueyffier, F.; Vanhems, P. *Intens. Care Med.*, **2006**, *32*, 1175.
- [19] Pachot, A.; Lepape, A.; Vey, S.; Bienvenu, J.; Mouglin, B.; Monneret, G. *Immunol. Lett.*, **2006**, *106*, 63.

- [20] Kox, W.J.; Volk, T.; Kox, S.N.; Volk, H.D. *Intens. Care. Med.* **2000**, *26*, S124-S128.
- [21] Lekkou, A.; Karakantza, M.; Mouzaki, A.; Kalfarentzos, F.; Gogos, C.A. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2004**, *11*, 161.
- [22] Albaiceta, G.M.; Pedreira, P.R.; Garcia-Prieto, E.; Taboada, F. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, **2007**, *6*, 191.
- [23] Roth, G.; Moser, B.; Krenn, C.; Brunner, M.; Haisjackl, M.; Almer, G.; Gerlitz, S.; Wolner, E.; Boltz-Nitulescu, G.; Ankersmit, H.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, *308*, 840.
- [24] Hotchkiss, R.S.; Osmon, S.B.; Chang, K.C.; Wagner, T.H.; Coopersmith, C.M.; Karl, I.E. *J. Immunol.*, **2005**, *174*, 5110.
- [25] Felmet, K.A.; Hall, M.W.; Clark, R.S.; Jaffe, R.; Carcillo, J.A. *J. Immunol.*, **2005**, *174*, 3765.
- [26] Venet, F.; Bohe, J.; Debard, A.; Bienvenu, J.; Lepape, A.; Monneret, G. *Crit. Care Med.*, **2005**, *33*, 2836.
- [27] Venet, F.; Pachot, A.; Debard, A.; Bohé, J.; Bienvenu, J.; Lepape, A.; Monneret, G. *Crit. Care Med.*, **2004**, *32*, 2329.
- [28] Meakins, J.L.; Pietsch, J.B.; Bubenick, O.; Kelly, R.; Rode, H.; Gordon, J.; MacLean, I.D. *Ann. Surg.*, **1977**, *186*, 241.
- [29] Christou, N.V.; Meakins, J.L.; Gordon, J.; Yee, J.; Hassan-Zahraee, M.; Nohr, C.W.; Shizgal, H.M.; MacLean, L.D. *Ann. Surg.*, **1995**, *222*, 534.
- [30] Rode, H.N.; Christou, N.V.; Bubenick, O.; Superina, R.; Gordon, J.; Meakins, J.L.; MacLean, L.D. *Clin. Exp. Immunol.*, **1982**, *47*, 155.
- [31] Lederer, J.A.; Rodrick, M.L.; Mannick, J.A. *Shock*, **1999**, *11*, 153.
- [32] Murphy, T.; Paterson, H.; Rogers, S.; Mannick, J.A.; Lederer, J.A. *Ann. Surg.*, **2003**, *238*, 401.
- [33] Heidecke, C.D.; Hensler, T.; Weighardt, H.; Zantl, N.; Wagner, H.; Siewert, J.R.; Holzmann, B. *Am. J. Surg.*, **1999**, *178*, 288.
- [34] Manjuck, J.; Saha, D.C.; Astiz, M.; Eales, L.J.; Rackow, E.C. *J. Lab. Clin. Med.*, **2000**, *135*, 153.
- [35] O'Mahony, J.B.; Palder, S.B.; Wood, J.J.; McIrvine, A.; Rodrick, M.L.; Demling, R.H.; Mannick, J.A. *J. Trauma*, **1984**, *24*, 869.
- [36] Faist, E.; Kupper, T.S.; Baker, C.C.; Chaudry, I.H.; Dwyer, J.; Baue, A.E. *Arch. Surg.*, **1986**, *121*, 1000.
- [37] Hensler, T.; Hecker, H.; Heeg, K.; Heidecke, C.D.; Bartels, H.; Barthlen, W.; Wagner, H.; Siewert, J.R.; Holzmann, B. *Infect. Immun.*, **1997**, *65*, 2283.
- [38] Puyana, J.C.; Pellegrini, J.D.; De, A.K.; Kodys, K.; Silva, W.E.; Miller, C.L. *J. Trauma*, **1998**, *44*, 1037.
- [39] Pellegrini, J.D.; De, A.K.; Kodys, K.; Puyana, J.C.; Furse, R.K.; Miller-Graziano, C. *J. Surg. Res.*, **2000**, *88*, 200.
- [40] Laudanski, K.; Miller-Graziano, C.; Xiao, W.; Mindrinos, M.N.; Richards, D.R.; De, A.; Moldawer, L.L.; Maier, R.V.; Bankay, P.; Baker, H.V.; Brownstein, B.H.; Cobb, J.P.; Calvano, S.E.; Davis, R.W.; Tompkins, R.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, 15564.
- [41] Bandyopadhyay, G.; De, A.; Laudanski, K.; Li, F.; Lentz, C.; Bankay, P.; Miller-Graziano, C. *Crit. Care Med.*, **2007**, *35*, 794.
- [42] Ochoa, J.B.; Makarenkova, V. *Crit. Care Med.*, **2005**, *33*, S510.
- [43] Chen, L. *Nat. Rev. Immunol.*, **2004**, *4*, 336.
- [44] Avicé, M.N.; Rubio, M.; Sergerie, M.; Delespesse, G.; Sarfati, M. *J. Immunol.*, **2001**, *167*, 2459.
- [45] Scumpia, P.O.; Delano, M.J.; Kelly, K.M.; Weinstein, J.S.; Wynn, J.L.; Winfield, R.D.; Xia, C.; Chung, C.S.; Ayala, A.; Atkinson, M.A.; Reeves, W.H.; Clare-Salzler, M.J.; Moldawer, L.L. *Blood*, **2007**, *110*, 3673.
- [46] Korman, A.J.; Peggs, K.S.; Allison, J.P. *Adv. Immunol.*, **2006**, *90*, 297.
- [47] Huang, X.; Venet, F.; Wang, Y.L.; Lepape, A.; Swan, R.; Chen, Y.; Chung, C.S.; Monneret, G.; Ayala, A. *FASEB J.*, **2008**, *22*, 675.
- [48] Das, S.; Suarez, G.; Beswick, E.J.; Sierra, J.C.; Graham, D.Y.; Reyes, V.E. *J. Immunol.*, **2006**, *176*, 3000.
- [49] Beswick, E.J.; Pinchuk, I.V.; Das, S.; Powell, D.W.; Reyes, V.E. *Infect. Immun.*, **2007**, *75*, 4334.
- [50] Wick, M.; Kollig, E.; Muhr, G.; Koller, M. *Arch. Surg.*, **2000**, *135*, 1309.
- [51] Pachot, A.; Monneret, G.; Voirin, N.; Leissner, P.; Venet, F.; Bohé, J.; Payen, D.; Bienvenu, J.; Mouglin, B.; Lepape, A. *Clin. Immunol.*, **2004**, *114*, 61.
- [52] Monneret, G.; Debard, A.L.; Venet, F.; Bohe, J.; Hequet, O.; Bienvenu, J.; Lepape, A. *Crit. Care Med.*, **2003**, *31*, 2068.
- [53] MacConmara, M.P.; Maung, A.A.; Fujimi, S.; McKenna, A.M.; Delisle, A.; Laphack, P.H.; Rogers, S.; Lederer, J.A.; Mannick, J.A. *Ann. Surg.*, **2006**, *244*, 514.
- [54] Scumpia, P.O.; Delano, M.J.; Kelly, K.M.; O'Malley, K.A.; Efron, P.A.; McAuliffe, P.F.; Brusko, T.; Ungaro, R.; Barker, T.; Wynn, J.; Atkinson, M.A.; Reeves, W.H.; Salzler, M.J.; Moldawer, L.L. *J. Immunol.*, **2006**, *177*, 7943.
- [55] Wisnoski, N.; Chung, C.S.; Chen, Y.; Huang, X.; Ayala, A. *Shock*, **2007**, *27*, 251.
- [56] Offner, H.; Subramanian, S.; Parker, S.M.; Wang, C.; Afentoulis, M.E.; Lewis, A.; Vandenbark, A.A.; Hum, P.D. *J. Immunol.*, **2006**, *176*, 6523.
- [57] Chen, X.; Baumel, M.; Mannel, D.N.; Howard, O.M.; Oppenheim, J.J. *J. Immunol.*, **2007**, *179*, 154.
- [58] Sakaguchi, S. *Annu. Rev. Immunol.*, **2004**, *22*, 531.
- [59] Fontenot, J.D.; Rudensky, A.Y. *Nat. Immunol.*, **2005**, *6*, 331.
- [60] Fontenot, J.D.; Gavin, M.A.; Rudensky, A.Y. *Nat. Immunol.*, **2003**, *4*, 330.
- [61] Hori, S.; Sakaguchi, S. *Microbes Infect.*, **2004**, *6*, 745.
- [62] Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Takahashi, T.; Ishida, Y.; Sakaguchi, S. *Nat. Immunol.*, **2002**, *3*, 135.
- [63] Venet, F.; Pachot, A.; Debard, A.L.; Bohe, J.; Bienvenu, J.; Lepape, A.; Powell, W.S.; Monneret, G. *J. Immunol.*, **2006**, *177*, 6540.
- [64] Lewkowicz, P.; Lewkowicz, N.; Sasiak, A.; Tchórzewski, H. *J. Immunol.*, **2006**, *177*, 7155.
- [65] Venet, F.; Chung, C.S.; Monneret, G.; Huang, X.; Horner, B.; Garber, M.; Ayala, A. *J. Leukoc. Biol.*, **2008**, *83*, 523.
- [66] Hirsh, M.; Dyugovskaya, L.; Kaplan, V.; Krausz, M.M. *Immunology*, **2004**, *112*, 153.
- [67] Chung, C.S.; Watkins, L.; Funches, A.; Lomas-Neira, J.; Cioffi, W.G.; Ayala, A. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2006**, *291*, R1338.
- [68] Wesche-Soldato, D.E.; Swan, R.Z.; Chung, C.S.; Ayala, A. *Curr. Drug Targets*, **2007**, *8*, 493.
- [69] Marchetti, P. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, **2005**, *33*, 632.
- [70] Hotchkiss, R.S.; Tinsley, K.W.; Swanson, P.E.; Grayson, M.H.; Osborne, D.F.; Wagner, T.H.; Cobb, J.P.; Coopersmith, C.; Karl, I.E. *J. Immunol.*, **2002**, *168*, 2493.
- [71] Hotchkiss, R.S.; Swanson, P.E.; Freeman, B.D.; Tinsley, K.W.; Cobb, J.P.; Matuschak, G.M.; Buchman, T.G.; Karl, I.E. *Crit. Care Med.*, **1999**, *27*, 1230.
- [72] Hotchkiss, R.S.; Tinsley, K.W.; Swanson, P.E.; Schmiege, R.E. Jr; Hui, J.J.; Chang, K.C.; Osborne, D.F.; Freeman, B.D.; Cobb, J.P.; Buchman T.G.; Karl I.E. *J. Immunol.*, **2001**, *166*, 6952.
- [73] Toti, P.; De Felice, C.; Oechini, R.; Schuerfeld, K.; Stumpo, M.; Epistolato, M.C.; Vatti, R.; Buonocore, G. *Am. J. Clin. Pathol.*, **2004**, *122*, 765.
- [74] Le Tulzo, Y.; Pangault, C.; Gacouin, A.; Guilloux V.; Tribut, O.; Amiot, L.; Tattevin, P.; Thomas, R.; Fauchet, R.; Drénon, B. *Shock*, **2002**, *18*, 487.
- [75] Peschon, J.J.; Morrissey, P.J.; Grabstein, K.H.; Ramsdell, F.J.; Maraskovsky, E.; Gliniak, B.C.; Park, L.S.; Ziegler, S.F.; Williams, D.E.; Ware, C.B.; Meyer, J.D.; Davison, B.L. *J. Exp. Med.*, **1994**, *180*, 1955.
- [76] Puel, A.; Ziegler, S.F.; Buckley, R.H.; Leonard, W.J. *Nat. Genet.*, **1998**, *20*, 394.
- [77] Alpdogan, O.; van den Brink, M.R. *Trends Immunol.*, **2005**, *26*, 56.
- [78] Snyder, K.M.; Mackall, C.L.; Fry, T.J. *Leuk. Lymphoma*, **2006**, *47*, 1222.
- [79] Kennedy, M.K.; Glaccum, M.; Brown, S.N.; Butz, E.A.; Viney, J.L.; Embers, M.; Matsuki, N.; Charrier, K.; Sedger, L.; Willis, C.R.; Brasel, K.; Morrissey, P.J.; Stocking, K.; Schuh, J.C.; Joyce, S.; Peschon, J.J. *J. Exp. Med.*, **2000**, *191*, 771.
- [80] Ceredig, R.; Rauch, M.; Balciunaitė, G.; Rolink, A.G. *Blood*, **2006**, *108*, 1216.
- [81] Lyman, S.D.; James, L.; Vanden Bos, T.; de Vries, P.; Brasel, K.; Gliniak, B.; Hollingsworth, L.T.; Picha, K.S.; McKenna, H.J.; Splett, R.R. *Cell*, **1993**, *75*, 1157.
- [82] Hannum, C.; Culpepper, J.; Campbell, D.; McClanahan, T.; Zurawski, S.; Bazan, J.F.; Kastelein, R.; Hudak, S.; Wagner, J.; Mattson, J. *Nature*, **1994**, *368*, 643.
- [83] McKenna, H.J.; Stocking, K.L.; Miller, R.E.; Brasel, K.; De Smedt, T.; Maraskovsky, E.; Maliszewski, C.R.; Lynch, D.H.; Smith, J.; Pulendran, B.; Roux, E.R.; Teepe, M.; Lyman, S.D.; Peschon, J.J. *Blood*, **2000**, *95*, 3489.
- [84] Wysocka, M.; Montaner, L.J.; Karp, C.L. *J. Immunol.*, **2005**, *174*, 7398.

- [85] Toliver-Kinsky, T.E.; Lin, C.Y.; Herndon, D.N.; Sherwood, E.R. *Infect. Immun.*, **2003**, *71*, 3058.
- [86] Parajuli, P.; Mosley, R.L.; Pisarev, V.; Chavez, J.; Ulrich, A.; Varney, M.; Singh, R.K.; Talmadge, J.E. *Exp. Hematol.*, **2001**, *29*, 1185.
- [87] Pulendran, B.; Smith, J.L.; Jenkins, M.; Schoenborn, M.; Maraskovsky, E.; Maliszewski, C.R. *J. Exp. Med.*, **1998**, *188*, 2075.
- [88] Salomon, B.; Lenschow, D.J.; Rhee, L.; Ashourian, N.; Singh, B.; Sharpe, A.; Bluestone, J.A. *Immunity*, **2000**, *12*, 431.
- [89] Liu, H.; Hu, B.; Xu, D.; Liew, F.Y. *J. Immunol.*, **2003**, *171*, 5012.
- [90] Scheffold, J.C.; von Haehling, S.; Corsepius, M.; Pohle, C.; Kruschke, P.; Zuckermann, H.; Volk, H.D.; Reinke, P. *Shock*, **2007**, *28*, 418-25.
- [91] Schwulst, S.J.; Muenzer, J.T.; Peck-Palmer, O.M.; Chang, K.C.; Davis, C.G.; McDonough, J.S.; Osborne, D.F.; Walton, A.H.; Unsinger, J.; McDunn, J.E.; Hotchkiss, R.S. *Shock*, **2008**, *29*, 441.
- [92] Kubach, J.; Lutter, P.; Bopp, T.; Stoll, S.; Becker, C.; Huter, E.; Richter, C.; Weingarten, P.; Warger, T.; Knop, J.; Müllner, S.; Wijdenes, J.; Schild, H.; Schmitt, E.; Jonuleit, H. *Blood*, **2007**, *110*, 1550.
- [93] Wesche, D.E.; Lomas-Neira, J.L.; Perl, M.; Chung, C.S.; Ayala, A. *J. Leukoc. Biol.*, **2005**, *78*, 325.
- [94] Hotchkiss, R.S.; Coopersmith, C.M.; Karl, I.E. *Clin. Infect. Dis.*, **2005**, *41*, S465.
- [95] Hotchkiss, R.S.; McConnell, K.W.; Bullock, K.; Davis, C.G.; Chang, K.C.; Schwulst, S.J.; Dunne, J.C.; Dietz, G.P.; Bähr, M.; McDunn, J.E.; Karl, I.E.; Wagner, T.H.; Cobb, J.P.; Coopersmith, C.M.; Pivnicka-Worms, D. *J. Immunol.*, **2006**, *176*, 5471.
- [96] McDunn, J.E.; Muenzer, J.T.; Rachdi, L.; Chang, K.C.; Davis, C.G.; Dunne, W.M.; Pivnicka-Worms, D.; Bernal-Mizrachi, E.; Hotchkiss, R.S. *FASEB J.*, **2008**, *22*, 561.
- [97] Weaver, J.G.; Rouse, M.S.; Steckelberg, J.M.; Badley, A.D. *FASEB J.*, **2004**, *18*, 1185.

Received: June 7, 2008

Revised: July 9, 2008

Accepted: July 21, 2008

Not For Distribution

Flow Cytometry Developments and Perspectives in Clinical Studies: Examples in ICU Patients

Fabienne Venet, Caroline Guignant, Guillaume Monneret.

Methods Mol Biol, 2011; 761:261-75

Chapter 18

Flow Cytometry Developments and Perspectives in Clinical Studies: Examples in ICU Patients

Fabienne Venet, Caroline Guignant, and Guillaume Monneret

Abstract

Septic syndromes represent a major, although largely under-recognized, healthcare problem worldwide accounting for thousands of deaths every year. Although flow cytometry (FCM) remains a relatively confidential diagnostic tool, it is useful at every step of intensive care unit (ICU) patients' management. This review will focus on biomarkers measurable by FCM on a routine standardized basis and usable for the diagnosis of sepsis and for prediction of adverse outcome, occurrence of secondary nosocomial infections or guidance of putative immunotherapy relative to innate and adaptive immune dysfunctions in ICU patients. Regarding early diagnosis of infection, neutrophil CD64 has been shown to be a highly sensitive and specific marker for systemic infection and sepsis in adults, neonates, and children. A diminished monocyte HLA-DR expression is a reliable marker for the development of monocyte anergy, secondary nosocomial infection, and death in critically ill patients. Finally, the measurement of an increased CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cell percentage may represent a reliable marker for the diagnosis of lymphocyte dysfunctions in these patients. These stainings can be performed using lyse-no-wash methods and results are available within 1 h. Ideally, these biomarkers should be part of a panel helping to define ICU patients' immune status. In the specific clinical context of ICU patients' monitoring, the increasing potential of FCM is further illustrated by the use of the biomarkers listed above as stratification tools in preliminary clinical studies. The next critical step is to use these standardized FCM protocols in large multicentric clinical trials testing individualized immunotherapy. Importantly, many other markers of immune dysfunction are currently under development that could further enable the administration of targeted individualized therapy in ICU patients.

Key words: Sepsis, flow cytometry, CD64, HLA-DR, regulatory T lymphocytes.

1. Introduction

1.1. Monitoring ICU Patients by Flow Cytometry

Despite marked improvements over the last decades, flow cytometry (FCM) remains a relatively confidential diagnostic tool. Indeed, clinical situations in which FCM is used on a routine

basis are still limited (e.g., lymphoma and leukaemia phenotyping, CD4⁺ T cell counting in HIV-infected patients, basophil testing in allergy, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria). However, we strongly believe that under standardized conditions, FCM is ready from prime time and vulgarization. In particular, a promising new domain of application for FCM is intensive care unit (ICU) with potential use at every step of patients' management: from the diagnostic to the definition of targeted and individualized therapy and finally, and most importantly, for the control of drug efficacy.

1.2. Sepsis Pathophysiology

Septic syndromes represent a major, although largely under-recognized, healthcare problem worldwide accounting for thousands of deaths every year. Mortality remains high ranging from 20% for sepsis to over 50% for septic shock despite almost 20 years of anti-inflammatory clinical trials (1, 2). Several recent lines of evidence now establish that death from septic shock is probably due to the effects of distinct mechanisms over time (1, 2). Early in the course of the disease, a massive release of inflammatory mediators (normally designated to trigger immune response against pathogens) is occurring that may be responsible for organ dysfunctions and hypoperfusion. Concomitantly, the body develops compensatory mechanisms to prevent overwhelming inflammation and dampen an overzealous anti-infectious response. These negative feedback mechanisms, although having protective effects during the first initial hours, may paradoxically become deleterious as they persist over time leading to immune paralysis (Fig. 18.1) (1, 2). Indeed, considerable clinical and experimental evidences indicate that patients rapidly present with numerous compromised immune functions (1, 2).

As our capacity to treat patients during the very first hours of shock has improved (early and aggressive initial supportive therapy) (1), many patients now survive this critical step but eventually die later in a state of immunosuppression that is illustrated by patients' difficulty to fight the primary bacterial

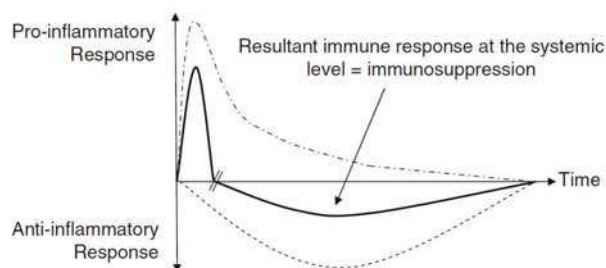


Fig. 18.1. Simplified description of systemic pro- and anti-inflammatory immune responses over time after septic shock. The *dashed lines* represent pro- or anti-inflammatory responses; the *bold line* represents the resultant at the systemic level. The shift from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory immune response predominant at the systemic level likely occurs before 24 h after diagnosis of shock.

infection and their decreased resistance to secondary nosocomial infections (1, 2). Consequently, immunostimulatory therapies are now considered as an innovative strategy for the treatment of sepsis. However, the first critical step is to beforehand identify patients who would actually benefit from these therapies. Indeed, in the absence of specific clinical signs of their immune response, it is therefore critical to determine the best biological tools for patients' stratification according to their immune status, a missing step in most of previous clinical trials (1, 2). This would define the right action (i.e., stimulating innate immunity and/or adaptive immunity, blocking apoptosis, restoring other altered functions) at the right time (early or delayed treatment) in the right patient (individualized/tailored therapy). This chapter will focus on biomarkers measurable by FCM on a routine standardized basis and usable for the diagnosis of sepsis (CD64 expression on neutrophil) and for prediction of adverse outcome, occurrence of secondary nosocomial infections, or guidance of putative immunotherapy relative to innate, Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) expression on monocytes, and adaptive (percentage of circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells) immune dysfunctions.

1.3. Diagnosis of Severe Infections: CD64 Expression on Neutrophils

Infection remains a major healthcare problem in hospitals and especially in the ICU where seriously ill patients with impaired immunity are readily exposed to pathogenic micro-organisms. Antibiotherapy, if appropriate and given early during the course of the infection, has been shown to reduce five times mortality in patients with septic shock (3). It is thus of vital importance for clinicians to detect severe infections at an early stage, when effective treatment and complete recovery are still possible. Usual biomarkers of infection such as procalcitonin (PCT) or C-reactive protein lack specificity (4). In particular, PCT has been shown to be a poor diagnosis marker of infection, although reliable for the monitoring of antibiotic efficacy (5, 6).

Recently, neutrophil CD64 has been shown to be a highly sensitive and specific marker for systemic infection and sepsis (4). The membrane molecule defined by monoclonal antibody CD64 is a high-affinity receptor (FcγRI) found on normal monocytes and only expressed at low levels by normal neutrophils. Neutrophil CD64 expression is regulated in a graded fashion in parallel with the degree of inflammatory response to a significant clinical process of infection or tissue injury (7). Neutrophil CD64 has been shown to be a highly sensitive and specific marker for systemic infection and sepsis in adults, neonates, and children. CD64 measurement has, for example, been shown to allow clinicians to discontinue antimicrobial treatment if negative within 24 h of suspected infection, without waiting for the definitive microbiological results (8).

Earlier studies on neutrophil CD64 were performed using cells isolated from whole blood using sedimentation or density gradient centrifugation. Neutrophil CD64 is now determined in whole blood without prior manipulation, using direct immunofluorescence and lyse-no-wash methods (9, 10).

Since CD64 expression is stable in EDTA-anticoagulated blood at least 24 h at room temperature, it is well suited for application in any clinical lab having access to a flow cytometer. This test is almost fully automated, the results are available rapidly (<20 min) and the assay can be performed on a 24/7 basis without specific expertise in flow cytometry (11).

1.4. Diagnosis of Monocyte Dysfunctions: HLA-DR Expression on Monocytes

Monocytes from septic patients are mainly characterized by a decreased capacity to mount a pro-inflammatory reaction upon a secondary bacterial challenge and by impairment in antigen presentation capacity most likely due to the lowered expression of major histocompatibility class II molecules (MHC class II). Regarding molecules expressed on monocytes, which are readily measured by standardized flow cytometry protocols, numerous studies have been performed regarding the measurement of HLA-DR expression.

Under normal conditions, monocytes strongly express HLA-DR on their surfaces. This molecule can thus easily be detected by flow cytometry. Monocytes with diminished or missing HLA-DR expression are markedly inhibited in their antigen-presenting function and in their ability to produce inflammatory mediators in response to a stimulus (2, 12). In septic patients, a decreased cell-surface expression of HLA-DR has regularly been observed on circulating monocytes (mHLA-DR) and there is now a general consensus that a diminished mHLA-DR expression is a reliable marker for the development of immunosuppression in critically ill patients (2). Indeed, a decreased mHLA-DR expression has been assessed as a predictor of septic complications after trauma, surgery, pancreatitis, burn patients, and after septic shock. In these studies, low levels of mHLA-DR (<40% of positive monocytes, normal values >90%) were observed in patients who subsequently developed nosocomial infections (2, 13–15). In contrast, in injured patients with uneventful recovery, mHLA-DR rapidly returned to normal values (in general in less than 1 week). Finally, decreased mHLA-DR has been shown to be predictive of adverse outcome in different groups of critically ill patients, including burn and septic shock patients (2, 13).

1.5. Diagnosis of T Lymphocyte Dysfunctions: Percentage of Circulating Regulatory T Cells

Due to their ability to interact not only with cells of the innate immune system but also with other cells of the adaptive response, T lymphocytes play a central role in anti-infectious immune response both as effectors and as regulators of this response. A growing body of evidence has now confirmed that lymphocyte-mediated immune response may be dysfunctional after severe

sepsis and may play a major role in the development of a state of immunosuppression in patients (16, 17).

T lymphocyte dysfunctions after severe sepsis include the occurrence of a state of anergy with a decreased proliferation to mitogen stimulation, a shift toward a Th2 profile of cytokine secretion, an increased apoptosis, and an increased percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes (Treg) (1, 2, 16, 18).

Treg have recently been reported as a potent regulatory T cell lineage playing an essential role in the control of both adaptive and innate immune responses (19). An increased Treg percentage has been described in septic shock patients (16, 20). A similar increase in Treg percentage has been observed in trauma patients and in mice after polymicrobial septic challenge and stroke (16). We recently observed a strong correlation between the increased Treg/effector ratio measured in whole blood after septic shock and the decreased proliferative response of patients' lymphocytes after mitogenic stimulation (21). This suggests not only that the measurement of Treg's percentage may represent a reliable marker for the diagnosis of lymphocyte dysfunctions in patients but also that these cells may play a central role in the development of immunoparalysis after sepsis.

In mice, although activated murine CD4⁺ T cells express CD25, the CD4⁺CD25⁺ phenotype identifies a largely homogeneous regulatory population. However, in humans, complications arise because of the presence of a sizeable population of activated CD4⁺ T cells that express CD25 (22). The CD4⁺CD25⁺ phenotype is therefore not Treg cell specific, and this lack of specificity is also exhibited by other surface markers, including glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein (GITR), CTLA-4, CD45RB, CD62L, neuropilin-1, CD103, and lymphocyte activation gene (LAG)-3, that have been shown to be overexpressed in Treg cell populations (22).

A more specific marker is the forkhead box (FOX)P3 transcription factor. However, this marker can only be used to isolate cells that are permeabilized and fixed and the staining procedure is long (around 3 h for completion) (23).

Two groups have recently addressed these issues by identifying the utility of CD127 expression for discriminating between CD25⁺ regulatory and CD25⁺-activated T cells (22, 24, 25). Sorted cells with the surface phenotype CD4⁺CD25⁺CD127^{low} had higher levels of intracellular FOXP3 and CTLA-4 and, as determined by functional assays, were suppressive, hypoproliferative, and poorly responsive to T cell receptor signaling (23).

Thus, a combination of CD25⁺ and CD127^{low} identified a regulatory population comprising approximately 6–8% of the CD4⁺ T cells in adults (22). The accuracy of this three-color staining for the monitoring of Treg in human blood is also further illustrated by the small variation in the percentage of Treg

measured in healthy individuals in different studies [6.35% of CD4⁺ T cells for Seddiki et al. (24), 7–8% for Liu et al. (25), 6% for Ndhlovu et al. (26), 8.34% for Hoffmann et al. (27), and 6.8% in our study (21)]. In this study, we verified that the combined expressions of CD4 and CD25 and the low expression of CD127 appeared adequate for the characterization of circulating Treg in whole blood of either healthy volunteers or septic shock patients (21). A significant increase in the percentage of circulating CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg in septic shock patients was measured in comparison with healthy individuals (21). This study showed the validity of the three-color flow cytometry staining (CD4/CD25/CD127) for the standardized routine monitoring of Treg in patients.

1.6. Targeted Individualized Therapy Based on Beforehand FCM-Measured Biomarkers

In the specific clinical context of ICU patients' monitoring, the increasing potential of FCM is further demonstrated by the use of the biomarkers listed above as stratification tools in preliminary clinical studies testing immunomodulating therapies. In particular, several clinical trials have recently used the measurement of mHLA-DR expression to stratify the administration of IFN- γ or GM-CSF in small cohorts of ICU patients (28–31). These studies showed promising results and such strategy should now be tested in clinical trials including a large number of patients.

Moreover, several other innovative immunotherapies may be proposed for the treatment of immune dysfunctions in ICU patients based on the beforehand measurement by FCM of biomarkers (Table 18.1). In particular, interleukin 7 (IL-7) represents an interesting candidate. This molecule is an essential cytokine for T lymphocyte development, survival, expansion, and maturation in humans (32).

Finally, beside markers listed in this chapter, other markers of immune dysfunctions measurable by FCM have been proposed. These include markers of apoptosis, increased co-signaling receptor expression such as PD-1, measurement of intracellular co-signaling pathways or circulating cytokine dosages using beads (Table 18.1). Again, under standardized protocols, these aspects have to be investigated in multicentric clinical trials.

2. Materials

2.1. Solutions

1. PBS: dissolve 8.0 g of NaCl, 0.2 g of KCl, 1.15 g of Na₂HPO₄, and 0.2 g of KH₂PO₄ in 1 l of distilled water (with adjusted pH at 7.4). This solution may be stored at 4°C up to 1 month.
2. Lysing solution with ammonium chloride: dissolve 41.45 g of NH₄Cl, 5.0 g of KHCO₃, and 185 mg of EDTA in

Table 18.1
Immune dysfunctions in septic patients: potential biomarkers and therapies

	Biomarker	Technique	Targeted therapy
Innate immune response	Functional testing ↓ <i>Ex vivo</i> cytokine production after TLR agonist stimuli	ELISA or CBA	GM-CSF G-CSF IFN- γ
	Cytokines ↑ Plasma IL-10	ELISA or CBA	AS101
	Cell surface marker expression ↓ mHLA-DR ↓ CD14, CD86, GM-CSF, CX3CR1 ...	FCM	GM-CSF G-CSF IFN- γ
	Apoptosis Depolarized mitochondria ↓ CD14	FCM	GM-CSF G-CSF IFN- γ
Adaptive immune response	Functional testing ↓ Proliferation after antigenic or non-specific stimulation	³ H-thymidine uptake or CFSE probes	IL-7 Ig IV
	Cell surface marker expression ↑ Inhibitory receptors: PD1, CTLA4, CD47 ... ↓ Co-activator receptors: CD28, CD3 ↑ % Treg	FCM	Anti-GITR agonistic Abs Ig IV
	Apoptosis ↓ T cell count ↑ Annexin V staining ↓ Bcl2 expression protein/gene Bax/Bcl-xl or Bax/Bcl2 ratios	FCM RT-PCR/FCM RT-PCR/FCM	IL-7 Caspase-inhibitors Ritonavir

TLR: toll-like receptor, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, CBA: cytometric bead array, HLA-DR: human leukocyte antigen-DR, FCM: flow cytometry, CFSE: carboxyfluorescein succinimidyl ester, Ig: immunoglobulin, IV: intravenous, GITR: glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, RT-PCR: real-time polymerase chain reaction.

500 ml of distilled water (with adjusted pH at 7.3). Store solution at 4°C, in an aluminium-covered bottle, up to 6 months. Before use, dilute the solution 1/10 in distilled water.

3. FACS lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA): dilute the solution 1/10 in distilled water. This solution may be stored at 4°C for up to 2 weeks.
4. Immunoprep reagent system (Beckman Coulter, Miami, FL) is composed of three reagents: Immunoprep A (erythrocyte lytic agent), Immunoprep B (leukocyte stabilizer), and Immunoprep C (cell membrane fixative).
5. Fixative solution: prepare 4% (v/v) solution of paraformaldehyde in PBS. This solution may be stored at 4°C for up to 2 weeks.

2.2. Antibodies

1. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD64 antibody.
2. FITC-labeled anti-CD14 antibody.
3. Phycoerythrin (PE)-labeled anti-HLA-DR antibody (clone L243) (BD Biosciences, San Jose, CA).
4. PE-labeled isotype controls (IgG2a – BD Biosciences, San Jose, CA).
5. FITC-labeled anti-CD25 antibody.
6. PE-labeled anti-CD127 antibody.
7. PE-Texas Red (ECD)-labeled anti-CD4 antibody.

2.3. Calibration/ Standardization Beads

PE fluorescence quantitation kit (Quantibrite PE – BD Biosciences, San Jose, CA). Reconstitute with 500 µl of buffer such as phosphate-buffered saline with azide plus 5 g/l bovine serum albumin and vortex-mix.

3. Methods

3.1. CD64 Expression

1. Collect samples of peripheral blood in EDTA anticoagulant tubes.
2. Mix 100 µl whole blood with 5–10 µl FITC-labeled anti-CD64 antibody (according to manufacture recommendations for whole blood staining).
3. Incubate at room temperature for 15 min in the dark.
4. Lyse red blood cells by adding 1 ml of ammonium chloride lysing solution.

3.2. Monocyte Major Histocompatibility Complex (mHLA-DR, MHC Class II-DR) Expression

5. Vortex and incubate at room temperature for 15 min in the dark.
 6. Add 3 ml of PBS, vortex, and centrifuge for 6 min at $300\times g$ at 10°C .
 7. Discard the supernatant and resuspend the pellet in $500\ \mu\text{l}$ of fixative solution.
 8. Flow cytometry gating strategy: neutrophils are readily gated out from other cells on a SSC/FSC bi-parametric dot-plot, and CD64 expression is then measured on their surface. Results are expressed as mean of fluorescence intensity (MFI) related to the entire neutrophil population.
1. Collect samples of peripheral blood in EDTA anticoagulant tubes.
 2. Mix $100\ \mu\text{l}$ whole blood with $10\ \mu\text{l}$ FITC-labeled anti-CD14 antibody and $20\ \mu\text{l}$ PE-labeled anti-HLA-DR antibody or respective isotype controls.
 3. Incubate at room temperature for 30 min in the dark.
 4. Lyse red blood cells by adding 1 ml of diluted FACS lysing solution.
 5. Vortex and incubate at room temperature for 15 min in the dark.
 6. Add 3 ml of PBS, vortex, and centrifuge for 6 min at $300\times g$ at 10°C .
 7. Discard the supernatant and resuspend the pellet in $500\ \mu\text{l}$ of fixative solution.
 8. Flow cytometry gating strategy. Monocytes are first gated out from other cells on the basis of labeling with FITC-CD14 (**Fig. 18.2a**) and mHLA-DR expression is then measured on their surface. All results are expressed either as percentages of HLA-DR-positive monocytes among the total monocyte population (a threshold is defined with the isotype control – **Fig. 18.2b**) or as MFI related to the entire monocyte population (12, 33). This method is fast and results are available within 1 h.
 9. Regarding calibration beads, the singlet bead populations are gated on a FSC vs SSC plot (**Fig. 18.2c**) and are analyzed with the histogram plot of FL2 (**Fig. 18.2d**). The number of HLA-DR molecule per monocyte can then be calculated either automatically (e.g., for Becton Dickinson flow cytometers, with BD CellQuest 3.1 and later versions) or manually by entering the geometric means of the four bead populations and the lot-specific values for the PE molecules per bead population on a statistics spreadsheet. The known ratio of PE to anti-HLA-DR antibody (the anti-HLA-DR antibody, clone L243, reacts with a non-polymorphic

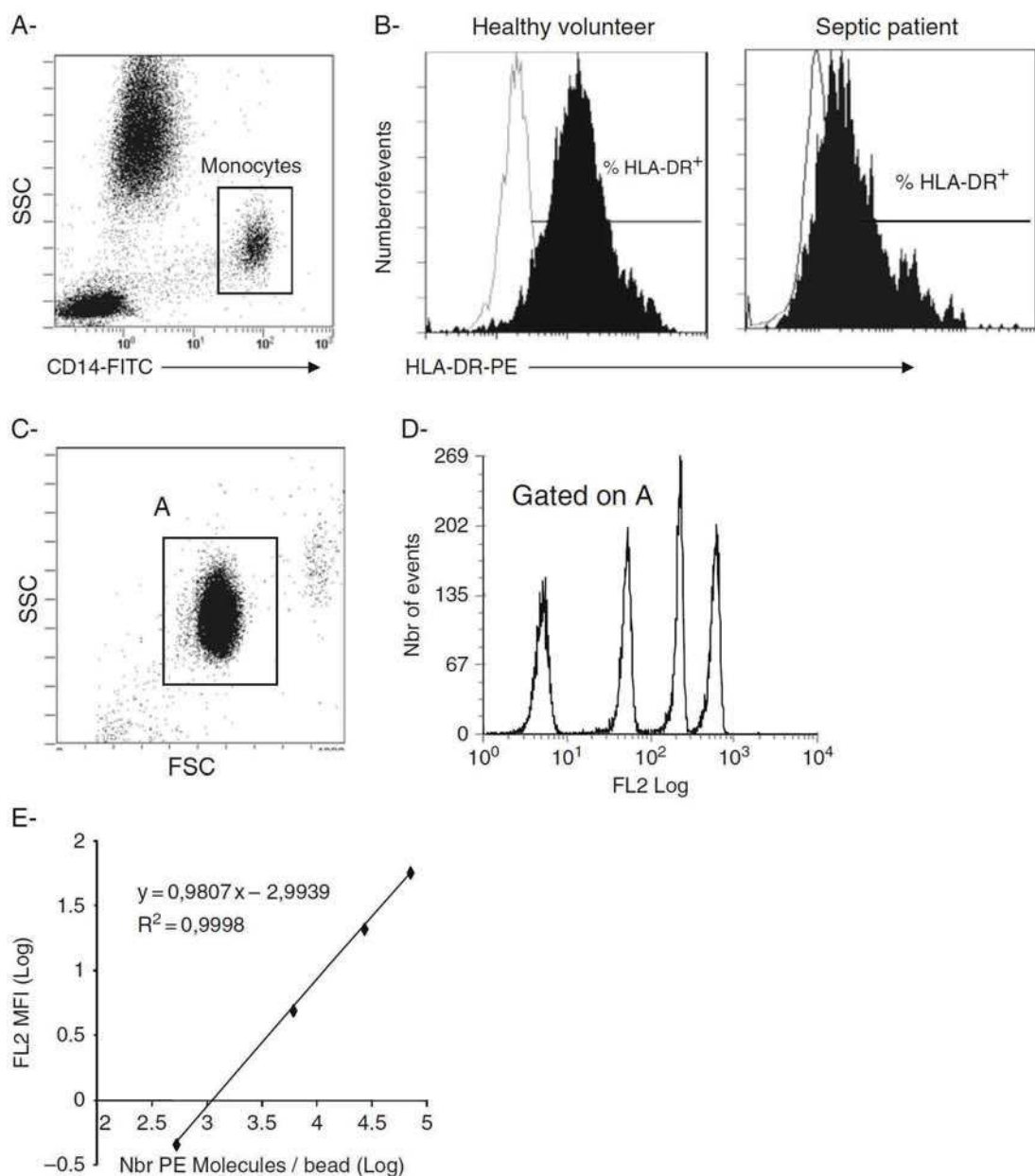


Fig. 18.2. Monocyte HLA-DR expression measurement by flow cytometry. **a** One representative CD14 vs SSC dot plot. **b** Representative HLA-DR linear histograms gated on monocytes in one healthy volunteer and septic patient (White histogram = isotype control). **c** A representative SSC vs FSC dot plot for the gating of singlet beads (Gate A). **d** Gated on A, a representative FL2 linear histogram. **e** Based on means of fluorescence intensity (MFI) measured on each bead subpopulation and on the number of PE molecule per bead given by the manufacturer, one representative calibration curve for the calculation of numbers of antibody bound per cells.

HLA-DR epitope and is conjugated with PE molecules in a 1:1 ratio) is used to convert the PE molecules per cell into antibodies per cell (AB/c) thanks to the generation of a calibration curve (Fig. 18.2e) (12).

3.3. Regulatory T Cells

1. Collect samples of peripheral blood in EDTA anticoagulant tubes.
2. Mix 100 μ l EDTA-anticoagulated whole blood with 5 μ l ECD-labeled anti-CD4, 10 μ l FITC-labeled anti-CD25, and 10 μ l PE-labeled anti-CD127 antibodies.
3. Incubate at room temperature for 15 min in the dark.
4. Red blood cells are then lysed using an automated technique (TQprep, Beckman Coulter) delivering Immunoprep[®] solution (when antibodies purchased from Beckman Coulter; if not, use ammonium chloride lysing solution as described in Section 3.1 – Step 4).
5. Flow cytometry gating strategy. CD4⁺ T cells are first gated on a SSC/CD4 bi-parametric dot-plot (Fig. 18.3a). The CD25⁺CD127^{low} gate is then set to encompass an obviously distinct population among CD4⁺ cells, as shown in Fig. 18.3b.

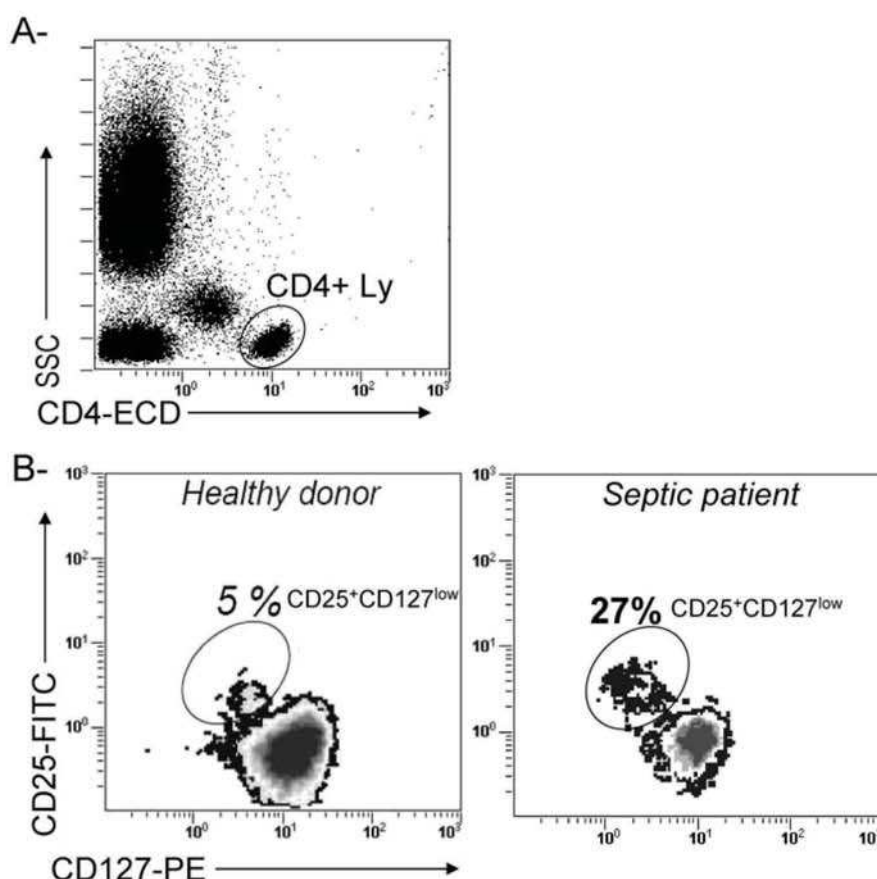


Fig. 18.3. CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cell measurement by flow cytometry. **a** One representative CD4 vs SSC dot plot that allows the gating of CD4⁺ lymphocytes (Ly). **b** Gated on CD4⁺ Ly, representative CD25 vs CD127 dot plots in one healthy volunteer and a septic patient. The CD25⁺CD127^{low} population is easily identified and its percentage is increased in septic patients.

3.4. Conclusions

Patients with sepsis present with features consistent with immunosuppression and stimulating their immune system may thus represent a promising therapeutic strategy. However, an absolute prerequisite for the next clinical trials is to systematically beforehand assess patients' immune functions to be able to define individualized immunotherapy. For that purpose, the measurement of biomarkers using standardized FCM protocols appears to be the appropriate tool for the forthcoming years. Eventually, FCM will provide a panel of biomarkers giving clinicians an overview of patients' immune status and thus indicate the best immunostimulating therapy to be initiated.

4. Notes

1. Regarding CD64 result expression, two methods have been primarily used: percentage of CD64⁺ cells and MFI, with or without calculating the number of molecules per cell. However, it is known that in infection and sepsis, the entire neutrophil population uniformly shifts to higher fluorescence (9). The only circumstances in which myeloid cells in blood show a skewed or bimodal distribution of the fluorescence histogram is in patients with immature granulocytes and with eosinophilia (9). Moreover, it has been demonstrated that the MFI distinguishes more reliably between different patients' groups than percent CD64⁺ cells (8). Therefore, the use of percent CD64⁺ neutrophils is not recommended as a measure of FcγRI expression. Moreover, in order to compare results between laboratories, it is desirable to standardize the assay using certified calibration beads (34). This renders the assay essentially independent of technique and antibodies and it enables laboratories to express CD64 in a quantitative manner as number of molecules per neutrophil.
2. A kit is available for CD64 measurement (and also CD163): Leuko64, Trillium Diagnostics, Brewer, ME, USA.
3. Because HLA-DR is a marker that is rapidly regulated, the storage temperature and the delay before staining are important issues. We compared results from fresh whole blood and those obtained after storage for 24 h at 4°C (33). In healthy donors, storage significantly increased MFI results. In septic patients, both the percentage values and the MFI were increased after storage. We also stored blood from five healthy donors at 37°C for 1 h and found a dramatic increase in the HLA-DR values measured for each sample, which supports a rapid nonspecific *in vitro* modulation of

this expression. Finally, we investigated the stability of HLA-DR expression at room temperature in five healthy patients. Our results indicated that samples should be stained within 1 h after sampling (33). Similarly, Döcke et al. observed that HLA-DR expression increased significantly after pre-analytical storage of blood for 2 h at room temperature, particularly in heparin- and citrate-anticoagulated blood. In contrast, the mean increase in HLA-DR values in EDTA blood stored on ice for 4 h was very low (12). However, our precision results illustrate that despite critical steps in the measurement, accurate determination of HLA-DR on monocytes allows day-to-day comparisons. In conclusion, use of EDTA blood, storage of unprocessed blood on ice as soon as possible before staining, and staining within 4 h after blood drawing were the conditions that produced the lowest variance between *ex vivo* values (12).

4. In mHLA-DR protocol, antibodies must be used at saturating concentrations to provide results as AB/c (33). If cells are fixed after staining, acquisition on FCM can be delayed by 24 h (35).
5. In mHLA-DR protocol, when MFI and calibrated beads for fluorescence quantification are used, results become comparable between different laboratories independent of the flow cytometer and the instrument settings (12).
6. In mHLA-DR protocol, a commercial kit using a similar staining procedure has been developed by BD Biosciences (QuantiBRITE™ Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5). This kit was used by Döcke et al. in an international multicentric feasibility study and showed good results especially when results were expressed as AB/c (12). Using this technique, reference values were defined: 13,200–42,500 AB/c for females and 15,300–40,100 AB/c for males (2.5th–97.5th percentiles, respectively) with median values of 26,200 AB/c for females and 25,300 AB/c for males (12).
7. As conventional CD4+ T cells tend to downregulate CD127 expression after TCR activation (36), Treg gating can be hindered in some cases.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Hospices Civils de LYON for their constant support over years.

References

- Hotchkiss, R. S. and Karl, I. E. (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* **348**, 138–150.
- Monneret, G., Venet, F., Pachot, A. and Lepape, A. (2008) Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med.* **14**, 64–78.
- Kumar, A., Ellis, P., Arabi, Y., Roberts, D., Light, B., Parrillo, J. E., et al. (2009) Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*. **136**, 1237–1248.
- Groselj-Grenc, M., Ihan, A., Pavcnik-Arnol, M., Kopitar, A. N., Gmeiner-Stopar, T. and Derganc, M. (2009) Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children. *Intensive Care Med.* **35**, 1950–1958.
- Nobre, V., Harbarth, S., Graf, J. D., Rohner, P. and Pugin, J. (2008) Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients: a randomized trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 498–505.
- Tang, H., Huang, T., Jing, J., Shen, H. and Cui, W. (2009) Effect of procalcitonin-guided treatment in patients with infections: a systematic review and meta-analysis. *Infection* **37**, 497–507.
- Davis, B. H., Olsen, S. H., Ahmad, E. and Bigelow, N. C. (2006) Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **130**, 654–661.
- Hoffmann, J. J. (2009) Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **47**, 903–916.
- Davis, B. H. and Bigelow, N. C. (2005) Comparison of neutrophil CD64 expression, manual myeloid immaturity counts, and automated hematology analyzer flags as indicators of infection or sepsis. *Lab. Hematol.* **11**, 137–147.
- Groselj-Grenc, M., Ihan, A. and Derganc, M. (2008) Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. *Mediators Inflamm.* **2008**, 202646.
- van der Meer, W., van Dun, L., Gunnewiek, J. K., Roemer, B. and Scott, C. S. (2006) Simultaneous determination of membrane CD64 and HLA-DR expression by blood neutrophils and monocytes using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser. *J. Immunol. Methods* **311**, 207–219.
- Docke, W. D., Hoflich, C., Davis, K. A., Rottgers, K., Meisel, C., Kiefer, P., et al. (2005) Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin. Chem.* **51**, 2341–2347.
- Venet, F., Tissot, S., Debard, A. L., Faudot, C., Crampe, C., Pachot, A., et al. (2007) Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: correlation with severity and secondary septic shock. *Crit. Care Med.* **35**, 1910–1917.
- Landelle, C., Lepape, A., Voirin, N., Tognet, E., Venet, F., Bohe, J., et al. (2010) Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* **36**, 1859–1966.
- Lukaszewicz, A. C., Griénay, M., Resche-Rigon, M., Pirracchio, R., Faivre, V., Boval, B., et al. (2009) Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit. Care Med.* **37**, 2746–2752.
- Venet, F., Chung, C. S., Monneret, G., Huang, X., Horner, B., Garber, M., et al. (2008) Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 523–535.
- Lederer, J. A., Rodrick, M. L. and Mannick, J. A. (1999) The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock*. **11**, 153–159.
- Remick, D. G. (2007) Pathophysiology of sepsis. *Am. J. Pathol.* **170**, 1435–1444.
- Belkaid, Y. (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 875–888.
- Monneret, G., Debard, A. L., Venet, F., Bohe, J., Hequet, O., Bienvenu, J., et al. (2003) Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit. Care Med.* **31**, 2068–2071.
- Venet, F., Chung, C. S., Kherouf, H., Geeraert, A., Malcus, C., Poitevin, F., et al. (2009) Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* **35**, 678–686.
- Banham, A. H. (2006) Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends Immunol.* **27**, 541–544.

23. Hartigan-O'Connor, D. J., Poon, C., Sinclair, E. and McCune, J. M. (2007) Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J. Immunol. Methods* **319**, 41–52.
24. Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., et al. (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1693–1700.
25. Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., et al. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1701–1711.
26. Ndhlovu, L. C., Loo, C. P., Spotts, G., Nixon, D. F. and Hecht, F. M. (2008) FOXP3 expressing CD127lo CD4+ T cells inversely correlate with CD38+ CD8+ T cell activation levels in primary HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 254–262.
27. Hoffmann, H. J., Malling, T. M., Topcu, A., Ryder, L. P., Nielsen, K. R., Varming, K., et al. (2007) CD4dimCD25bright Treg cell frequencies above a standardized gating threshold are similar in asthmatics and controls. *Cytometry A* **71**, 371–378.
28. Docke, W. D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., et al. (1997) Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med.* **3**, 678–681.
29. Kox, W. J., Bone, R. C., Krausch, D., Docke, W. D., Kox, S. N., Wauer, H., et al. (1997) Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch. Intern. Med.* **157**, 389–393.
30. Meisel, C., Schefold, J. C., Pischowski, R., Baumann, T., Hetzger, K., Gregor, J., et al. (2009) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 640–648.
31. Drossou-Agakidou, V., Kanakoudi-Tsakalidou, F., Sarafidis, K., Tzimouli, V., Taparkou, A., Kremenopoulos, G., et al. (2002) In vivo effect of rhGM-CSF and rhG-CSF on monocyte HLA-DR expression of septic neonates. *Cytokine* **18**, 260–265.
32. Sportes, C. and Gress, R. E. (2007) Interleukin-7 immunotherapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **601**, 321–333.
33. Monneret, G., Elmenkouri, N., Bohe, J., Debard, A. L., Gutowski, M. C., Bienvenu, J., et al. (2002) Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin. Chem.* **48**, 1589–1592.
34. Nuutila, J., Hohenthal, U., Laitinen, I., Kotilainen, P., Rajamaki, A., Nikoskelainen, J., et al. (2007) Simultaneous quantitative analysis of FcγRI (CD64) expression on neutrophils and monocytes: a new, improved way to detect infections. *J. Immunol. Methods* **328**, 189–200.
35. Finck, M. E., Elmenkouri, N., Debard, A. L., Bohe, J., Lepape, A., Bienvenu, J., et al. (2003) Preliminary results in standardization of flow cytometry protocols for monocytic HLA-DR measurement and their application in the follow up of septic shock. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **61**, 441–448.
36. Mazzucchelli, R. and Durum, S. K. (2007) Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 144–154.

RESUME

En dépit de nombreux essais thérapeutiques, les syndromes septiques sont la première cause de mortalité en service de soins intensifs. La population septique étant très hétérogène, une meilleure caractérisation des patients serait essentielle afin de mieux individualiser et cibler les thérapeutiques potentiellement bénéfiques. Une approche multiparamétrique de l'utilisation des biomarqueurs est une alternative qui viserait à appréhender la situation de manière plus globale. Notre travail s'inscrit dans ce contexte au travers de l'étude plus spécifique de la défaillance des systèmes cardio-vasculaire et immunitaire. Au-delà de la confirmation de l'intérêt des biomarqueurs présentement étudiés (pro-hormones cardio-vasculaires et PD-1) dans la prédiction de la mortalité et du risque d'infections nosocomiales, nos résultats apportent des éléments nouveaux. Nous avons montré que (1) la surexpression des molécules PD-1 est associée à l'anergie leucocytaire, (2) un même biomarqueur peut apporter une information différente au cours du temps, (3) l'information apportée par l'analyse simultanée de deux biomarqueurs est supérieure à celle de la somme de leurs valeurs individuelles, et (4) l'expression dynamique d'un biomarqueur est meilleure que son expression à un temps donné. Au total, notre travail illustre l'intérêt potentiel d'un panel de biomarqueurs pour mieux appréhender la complexité des états septiques et leur rapide évolution. Il reste néanmoins à développer des outils biostatistiques capables de donner au clinicien une vision globale en temps réel des processus en cours. Cela constituera une étape clé pour mieux stratifier et cibler les prochains essais cliniques dans le domaine.

Biomarkers in severe sepsis: toward new individualized therapeutic strategies

Septic syndromes remain the leading cause of death in the intensive care units despite numerous clinical trials. Septic patients constitute a very heterogeneous population. Therefore improved characterisation of patients in order to better target and personalize potential new therapeutics is highly desirable. A multiparametric biomarker-based approach could be an attractive alternative to obtain a global view of the pathophysiologic situation.

In this context, we worked specifically on cardio-vascular and immune dysfunctions. We first confirmed the predictive value of biomarkers for mortality or nosocomial infections, and showed new elements. We observed that (1) PD-1 overexpression is associated with leukocyte anergy, (2) one biomarker could give different information over time, (3) information provided by the association of two biomarkers is more interesting than the addition of their individual values, and (4) dynamic expression of one biomarker is more informative than its expression at a given time point. Finally, our results illustrate the potential interest of biomarker panels to improve our understanding of the septic syndrome complexity and to reflect their rapid evolution. Consequently, next step will depend on our capacity to develop biostatistic tools that enable clinicians to get, in real time, a global view of the process over time. This key step is likely necessary to decrease the heterogeneity of septic patient population in order to better stratify and target next clinical trials in the field.

MOTS-CLES

Choc septique, sepsis, biomarqueur, mortalité, infection nosocomiale, adrénomédulline, endothéline1, peptide natriurétique auriculaire, vasopressine, PD-1

Septic shock, sepsis, biomarker, death, nosocomial infection, adrenomedullin, endothelin1, atrial natriuretic peptide, vasopressin, PD-1

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Immunologie de l'Hôpital E. Herriot (69003 Lyon) au sein de l'EAM 4174 « Hémostase, inflammation et sepsis » (HCL/Lyon1) en collaboration avec les services de Réanimation du Centre Hospitalier Lyon-Sud et de l'Hôpital E. Herriot.