

Université de Sherbrooke

Impact d'un traitement aux corticostéroïdes sur la paralysie des fonctions des neutrophiles chez des patients atteints de sepsis sévère et choc septique réfractaire

Par
Julie Lamoureux
Département de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *Maître ès Sciences* (M. Sc.)
en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Janvier, 2016

Membres du jury d'évaluation
Pr Denis Girard, INRS, toxicologie envir./pharmacochimie
Pr Éric Rousseau, FMSS, obstétrique-gynécologie
Pr Olivier Lesur, Médecine, services interdépartemental
de soins intensifs et de pneumologie
Pr Tamás Fülöp, Médecine, service de gériatrie

© Julie Lamoureux, 2016

À celle qui n'en sait jamais assez.

« J'éprouve l'émotion la plus forte devant le mystère de la vie. Le sentiment fonde le beau et le vrai, il suscite l'art et la science. »

ALBERT EINSTEIN

RÉSUMÉ

Impact d'un traitement aux corticostéroïdes sur la paralysie des fonctions des neutrophiles chez des patients atteints de sepsis sévère et choc septique réfractaire

Par
Julie Lamoureux
Département de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

RÉSUMÉ

Le sepsis sévère et le choc septique réfractaire sont d'incidences grandissantes dans la population et restent actuellement un défi de taille avec une mortalité variant de 30 à 70 % à 28 jours malgré l'amélioration du traitement de support. Les corticostéroïdes (CS) sont un traitement d'appoint controversé dans le sepsis sévère et le choc septique réfractaire. Ils modulent entre autre les fonctions des neutrophiles ou *polymorphonuclear neutrophils cells* (PMN) qui sont des acteurs de 1^{ère} ligne dans la défense immédiate contre le sepsis et les défaillances organiques associées.

Résultats : Le sepsis a pour effet de diminuer l'activité phagocytaire, ainsi que la production de radicaux libres oxygénés (ROS) des PMN au jour 1 (J1) et jour 3 (J3). Il augmente l'adhésion qui s'intensifie avec la sévérité de la maladie et persiste jusqu'à J3. Au niveau de la dégranulation, le sepsis augmente la production et la libération de la pentraxine 3 (PTX3). Le sepsis affecte le profil phénotypique des PMN en augmentant l'expression de CD66b et ST2 à J1 et J3. Il accentue également l'expression de CD64. Dans le groupe 2 (G2), ce niveau d'expression diminue à J3. Aucun effet significatif sur le chimiotactisme n'a été observé à J1, ni J3. L'usage de CS *in vitro* retarde l'apoptose à J1 et J3 dans le groupe 1 (G1), mais ne démontre aucune amélioration significative des fonctions des PMN ou au niveau de leur profil phénotypique.

Conclusion : Le sepsis entraîne une immunoparalysie des PMN au niveau de leur migration et des fonctions effectrices. Non seulement cette paralysie augmente avec la sévérité de la maladie, mais elle persiste également après 3 jours suivant l'admission. De faibles doses de CS *in vitro* et *in vivo* dans le traitement du choc septique n'ont pas d'effet déterminant sur les PMN dans l'amélioration du pronostic des patients. Davantage de recherches seront nécessaires afin d'approfondir notre compréhension de l'impact d'un traitement aux CS sur les fonctions neutrophiliques dans un contexte septique. Ces derniers permettraient non seulement de mieux cibler leur utilisation dans le but d'arriver à un rapport bénéfique/risque avantageux dans le choc septique, mais aussi pour d'autres maladies inflammatoires.

Mots clés : Apoptose, chimiotactisme, choc septique, corticostéroïdes, explosion oxydative, neutrophiles, phagocytose, sepsis sévère

SUMMARY

Impact of corticosteroid treatment on the paralysis of neutrophil functions in severe sepsis and refractory septic shock patients

By
Julie Lamoureux
Faculty of medicine

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of Master degree diploma (M.Sc.) in physiology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

SUMMARY

With the increasing rates of severe sepsis and refractory septic shock, there is still a challenge in mortality rates between 30 and 70 % at 28 days despite improved supportive care. Corticosteroids (CS) are a controversial supportive treatment in severe sepsis and refractory septic shock. They modulate the functions of PMN that are players in first line of immediate defence against the sepsis and associated to multiorgan failures.

Results : Sepsis leads to a reduced phagocytic activity and ROS production at day 1 (D1) and day 3 (D3). It enhances the adhesion which increases with the severity of sepsis and persists until D3. In terms of degranulation, the sepsis increases the production and release of PTX3. Sepsis affects the phenotypic profile of PMN that increases the expressions of CD66b and ST2 at D1 and D3. It increases the CD64 expression but decreased at D3 in G2. No significant effect on chemotaxis was observed in D1, neither in D3. In G1, use of CS *in vitro* further delays apoptosis at D1 and D3, but is not showing any improvement in functions of PMN or in phenotypic profile.

Conclusions : Sepsis induces an immune paralysis of PMN in their migration and effective functions. Not only this paralysis increases with the severity of the sepsis, but it also persists after 3 days following the admission. Low doses of CS *in vitro* and *in vivo* in the treatment of septic shock have not determinant effect on PMN in improvement of the outcome of patients. More research is needed to learn more about the impacts of CS treatment on PMN functions in sepsis. This would contribute not only to ensure a better targeting of their use in order to achieve an advantageous benefits/risks ratio in septic shock, but also for others inflammatory diseases.

Keywords : Apoptosis, chemotaxis, corticosteroids, neutrophils, oxidative burst, phagocytosis, severe sepsis, septic shock

TABLE DES MATIERES

Résumé	iv
Summary	v
Table des matières	vi
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Introduction	1
CHAPITRE 1: LES NEUTROPHILES DANS UN CONTEXTE INFECTIEUX	2
1.1 Morphologie des neutrophiles	2
1.2 Migration des neutrophiles	3
1.3 Réponses effectrices des neutrophiles lors d'une infection	6
1.3.1 Dégranulation.....	6
1.3.2 Phagocytose	8
1.3.2.1 <i>Reconnaissance des pathogènes</i>	8
1.3.2.1.1 <i>Récepteurs Fc</i>	9
1.3.2.1.2 <i>Récepteurs Toll-like</i>	10
1.3.2.1.3 <i>Axe IL-33/ST2</i>	11
1.3.2.1.4 <i>Récepteurs CD66</i>	12
1.3.2.2 <i>Formation du phagosome</i>	13
1.3.3 Production de radicaux libres oxygénés	13
1.3.4 Captation de dérivés bactériens	15
1.3.5 Production de médiateurs inflammatoires	15
1.4 Résolution de l'inflammation	17
1.4.1 Apoptose	18
1.4.2 Devenir des neutrophiles	20
CHAPITRE 2: LE SEPSIS	21
2.1 Le sepsis.....	21
2.1.1 Définition du sepsis	21
2.1.2 Épidémiologie du sepsis	22

2.1.3 Conséquences cardiovasculaires et hématologiques.....	23
2.2 Les traitements du sepsis sévère et du choc septique	26
2.2.1 Cibles thérapeutiques du sepsis sévère et choc septique	26
2.2.2 Les corticostéroïdes	28
2.2.2.1 <i>Types de corticostéroïdes naturels</i>	28
2.2.2.2 <i>Traitement par les corticostéroïdes</i>	30
CHAPITRE 3: LES NEUTROPHILES LORS DU SEPSIS	33
3.1 Fonctions neutrophiliques altérées.....	33
3.1.1 Libération des neutrophiles.....	33
3.1.2 Chimiotactisme	34
3.1.3 Adhésion	36
3.1.3.1 <i>Altérations dans la rigidité et la séquestration des PMN</i>	37
3.1.3.2 <i>Altérations dans l'expression de récepteurs membranaires des PMN</i>	37
3.1.4 Dégranulation.....	38
3.1.5 Phagocytose	38
3.1.6 Production de radicaux libres oxygénés	40
3.1.7 Apoptose	41
3.2 Production de médiateurs de l'inflammation altérée.....	42
3.3 Impact des corticostéroïdes sur les fonctions neutrophiliques.....	43
Article.....	46
Avant-propos	46
Résumé de l'article.....	46
<i>Paralysed neutrophil functions and corticosteroids in severe sepsis and refractory septic shock patients</i>	48
Discussion	77
Limitations et perspectives	84
Conclusions.....	85
Remerciements	86
Liste des références	87
Annexes.....	106

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Modèle de la cascade de migration des PMN vers le site inflammatoire dans un contexte infectieux.....	5
Figure 2 Activation des PMN et amplification schématisée de la réponse inflammatoire..	17
Figure 3 Régulation de la synthèse de cortisol par l'axe hypothalamo-hypophysaire.	30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Critères de diagnostic du sepsis, sepsis sévère et choc septique.	22
Tableau 2 Équivalence des traitements corticoïdes et demi-vie biologique de l'effet anti-inflammatoire.....	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
APACHE II	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>
ATCH	Hormone adrénocorticotrope
Bax	<i>BCL-2-like protein 4</i>
Bim	<i>BCL-2-like protein 11</i>
BPI	<i>Bactericidal/Permeability-Increasing protein</i>
BV	Biliverdine
C3b	<i>Complement component 3</i>
C5a	<i>Complement component 5</i>
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i>
CIDV	Coagulation intravasculaire disséminée
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité-II
CPAg	Cellules présentatrices d'antigènes
CR	<i>Complement Receptor</i>
CRH	<i>Corticotropin-Releasing Hormone</i>
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
CS	Corticostéroïdes
CXCR2	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FAS	<i>Apoptosis Stimulating Fragment</i>
FcγRII	<i>Fc Receptor for IgG</i>
fMLF	Peptide formylé
GC	Glucocorticoïdes
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRK2	<i>G protein-coupled Receptor Kinase-2</i>
HHH	Hème/Hémopexine/Hème oxygénase-1

HPx	Hémopexine
HO-1	Hème oxygénase-1
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ICU	Unité de soins intensifs
IFN	Interféron
IL-1RA	<i>Interleukine-1 Receptor Antagonist</i>
IL-1RAP	<i>IL-1 Receptor Accessory Protein</i>
IRAK	<i>IL-1 Receptor Associated serine Kinase</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
JAM	<i>Junction Adhesion Molecule</i>
LFA-1	<i>Leucocyte Function-associated Antigen-1</i>
LRP-1	<i>Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>
LT	Leucotriène
LX	Lipoxine
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MC	Minéralocorticoïdes
Mcl-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1</i>
MIP-2	<i>Macrophage Inflammatory Protein-2</i>
MNDA	<i>Myeloid Nuclear Differentiation Antigen</i>
MOF	<i>Multiple-Organ Failure</i>
MP	Microparticules
MPO	Myéloperoxydase
MPOC	Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i>
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
NF	<i>Nuclear Factor</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Monoxyde d'azote
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>

PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PMA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear neutrophil cells</i>
PPAR- γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ</i>
PRR	<i>Pathogen Recognition Receptor</i>
PR3	Protéinase 3
PTX3	Pentraxine 3
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-1	<i>Retinoic-acid-Inducible Gene 1-like</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RV	Résolvine
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
SDRA	Syndrôme de Détresse Respiratoire Aigu
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SRIS	Syndrôme de Réponse Inflammatoire Systémique
sST2	Récepteur à l'interleukine-33 soluble
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TIRAP	<i>Toll-Interleukin 1 Receptor domain containing Adaptor Protein</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TRAIL	<i>Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion molecule-1</i>

INTRODUCTION

Mise en contexte

Le sepsis sévère et le choc septique sont des infections sévères fréquentes dans le milieu hospitalier. Outre la prise en charge immédiate par une antibiothérapie adaptée, le traitement actuel se traduit par un support de l'hémodynamique systémique et l'administration d'agents vasopresseurs lorsque nécessaire. L'utilisation de CS systémiques comme agents modulateurs dans le traitement du choc septique réfractaire demeure controversé depuis quelques années même s'ils sont prescrits fréquemment. À ce jour, plusieurs impacts directs ont été décrits sur l'activité et le profil phénotypique des PMN qui ont un rôle de première ligne dans le sepsis. Toutefois, leurs comportements sont variables et parfois même contradictoires dans la littérature.

L'hypothèse principale de cette étude se définit comme suit : les CS administrés *in vitro* et *in vivo* vont influencer les PMN sanguins de patients atteints de sepsis sévère et choc septique réfractaire de manière à favoriser et entretenir certaines fonctions déterminantes telles que le prolongement de la survie, le chimiotactisme, l'adhésion, la phagocytose et la dégranulation des PMN. De plus, ce traitement modifiera leur profil phénotypique soit en augmentant l'expression du récepteur de l'hémopexine (HPx), CD91, ou en diminuant la surexpression d'hème oxygénase 1 (HO-1).

Le chapitre 1 présentera le fonctionnement physiologique et la réponse inflammatoire des PMN dans un contexte infectieux. Ceci permettra dans un premier temps de comprendre le comportement normal des PMN lors d'une infection et dans un deuxième temps, d'introduire et définir une condition inflammatoire particulière, le sepsis, dans le second chapitre. Le troisième chapitre mettra en lumière comment le sepsis ainsi que les CS utilisés fréquemment comme traitement (hydrocortisone, prednisone et méthylprednisolone) affectent les différentes réponses effectrices des PMN ainsi que leur profil phénotypique.

CHAPITRE 1

Les neutrophiles dans un contexte infectieux

Les PMN jouent un rôle de premier plan au niveau de l'immunité innée dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. L'élimination de bactéries est dépendante d'un recrutement rapide et en grand nombre de ces cellules de la circulation sanguine vers le site d'infection. Ils doivent par conséquent être aptes à s'adhérer aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et migrer en réponse à un gradient de stimuli chimioattractants vers le site d'infection ou inflammatoire (Mayadas *et al.*, 2014).

1.1 Morphologie des neutrophiles

Les PMN font partis de la famille des granulocytes (ou polymorphonucléaires) composée également des éosinophiles et des basophiles. Ils sont caractérisés par un noyau possédant 2 à 5 lobes qui sont réunis par de fins étranglements. Ce nombre augmente plus les cellules sont âgées. Les granulocytes sont caractérisés par la présence de granules contenus dans leur cytoplasme. On distingue les différents types de cellules appartenant à cette famille par l'affinité de leurs granules pour certains colorants. Les PMN dont la taille varie de 10 à 20 μm de diamètre retiennent les colorants neutres. Chez l'humain, ce sont les globules blancs les plus abondants dans la circulation sanguine et représentent 50 à 70% des leucocytes sanguins. Leur principal rôle consiste à intervenir lors d'infections et de réponses inflammatoires provoquées par des bactéries, des toxines ou des débris cellulaires (Edwards, 2005). Arrivés au terme de leur maturation dans la moelle osseuse, les PMN circulent dans les vaisseaux sanguins jusqu'au(x) site(s) d'infection ou inflammatoire(s). Les PMN adhèrent alors à la paroi des vaisseaux, s'insèrent entre les cellules endothéliales grâce à leur déformabilité, s'étirent à travers l'interstice et s'introduisent dans le tissu conjonctif. Leur nombre est particulièrement élevé dans un contexte inflammatoire aiguë (Borregaard, 2010).

1.2 Migration des neutrophiles

La synthèse des PMN se produit dans la moelle osseuse au cours de l'hématopoïèse en réponse à plusieurs cytokines, dont principalement le G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*) (Borregaard, 2010; Amulic *et al.*, 2012). Ils seront libérés dans la circulation sanguine pendant une courte période dont le temps de demi-vie varie traditionnellement de 8 à 12 heures et jusqu'à 1 à 2 jours dans les tissus (Basu *et al.*, 2002; Mayadas et Cullere, 2005). Contrairement à l'approche conventionnelle, soit par des manipulations ou des marquages *ex vivo*, une étude basée sur le marquage *in vivo* au deutérium a démontré que la durée de survie des PMN circulatoires pouvait se poursuivre jusqu'à 5 jours sous des conditions homéostatiques (Pillay *et al.*, 2010). Il s'avère toutefois que cette différence majeure de la demi-vie des PMN reste controversée à ce jour (Tofts, *et al.*, 2011; Tak *et al.*, 2013).

Les PMN se déplacent par la formation de pseudopodes dont les extrémités s'adhèrent à un support (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). La rétraction des microfibrilles et des microtubules permet de détacher la partie postérieure des PMN et d'entraîner leur contenu. Ils vont migrer activement au site d'inflammation par un processus chimiotactique par lequel le déplacement de cellules mobiles est orienté vers certaines substances chimiques présentes dans l'environnement. En absence d'infection ou d'inflammation, les PMN en circulation sondent continuellement et aléatoirement la paroi des vaisseaux, dont la fréquence est plus élevée dans les capillaires en raison du débit sanguin et de l'espace réduit. Ces restrictions facilitent la rencontre des PMN avec les cellules endothéliales stimulées, le cas échéant. Les PMN expriment constitutivement deux protéines essentielles à la reconnaissance de signaux inflammatoires : la glycoprotéine PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) et la sélectine-L (leucocytaire) (McEver, 2010). Ces molécules retiennent les sélectines-P et -E (plaquettaires et endothéliales) exprimées par les cellules endothéliales s'il y a présence à ce moment de dérivés bactériens comme des lipopolysaccharides (LPS) ou des peptides formylés (fMLF) et permettent l'adhésion transitoire des PMN à la surface des vaisseaux (Ley, 2002). L'alternance de la formation et de la rupture de ces interactions faibles permettent de décélérer le flot de PMN afin que ceux-ci soient exposés au signal inflammatoire des cellules endothéliales. On qualifie alors

cette étape de roulement ou « *rolling* » des PMN sur la paroi du vaisseau sanguin (Amulic *et al.*, 2012). Ces liaisons activent chez les PMN une variété de kinases telles que les familles de kinases Src (*Proto-oncogen tyrosine-protein kinase Src*), PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) et p38 MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) qui mèneront à l'expression et l'activation des intégrines nécessaires à l'adhésion ferme. Ce type d'adhésion est médié par les protéines de la famille des intégrines $\beta 2$ (LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*) et Mac-1 (*Macrophage-1 antigen*)). Le roulement des PMN le long de l'endothélium, les interactions avec les sélectines, les chimioattractants, les cytokines et les produits dérivés bactériens vont déclencher l'activation et le regroupement des intégrines $\beta 2$ à leur surface. Les intégrines activées pourront alors lier leurs ligands comme les molécules d'adhésion ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*) afin d'arrêter leur roulement et favoriser le rampeement des cellules jusqu'à un site de transmigration favorable (Amulic *et al.*, 2012). Cette adhésion ferme, leur déformabilité ainsi que les récepteurs tels que JAM (*Junctional adhesion molecule*) et PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*) permettront aux PMN de traverser l'endothélium en s'immisçant dans les espaces intercellulaires (aussi peu que 3 μ) en suivant un gradient chimiotactique jusqu'au site d'infection dans le tissu. La migration à travers un gradient de concentration de chimioattractant est un processus clé dans l'activation des PMN. En effet, un chimioattractant individuel peut induire différents effets sur les PMN dépendamment de la concentration dans laquelle il se trouve ou faciliter la réponse d'autres chimioattractants. Lorsque les PMN sont exposés à de faibles concentrations d'IL-8, cela favorise la perte des sélectines-L et l'expression des intégrines $\beta 2$, alors que des doses plus élevées initient l'explosion oxydative (Ley, 2002). À la plus forte concentration, IL-8 induit la dégranulation des PMN. Une fois qu'ils ont atteint les pathogènes, ils peuvent alors exercer plusieurs mécanismes tels que la dégranulation, la phagocytose, la production de ROS et la formation de NETs (*Neutrophils Extracellular Traps*) afin de les éliminer. De surcroît, ils libéreront des cytokines pro-inflammatoires afin d'amplifier la réponse immunitaire en favorisant le recrutement des PMN et autres types immunitaires (Amulic *et al.*, 2012). Parmi ces médiateurs inflammatoires, le TNF α (*Tumor necrosis factor alpha*), IL-1 β , IL-6 et IL-17 seront entre autre libérés dans la circulation sanguine. L'activation des PMN est un modulateur de la réponse subséquente de ces

cellules. Même si les cellules non activées sont capables de toutes les fonctions associées à leur activation, la réponse sera plus importante si elles ont été préalablement activées. Toutes les fonctions effectrices et leur phénotype en sont affectés. Toutefois, l'activation des PMN ne doit pas être perçue comme un état marche/arrêt, mais comme un continuum de différents états d'activation dépendants de la nature et de la concentration de l'agent qui le déclenche (Swain *et al.*, 2002) (Fig. 1).

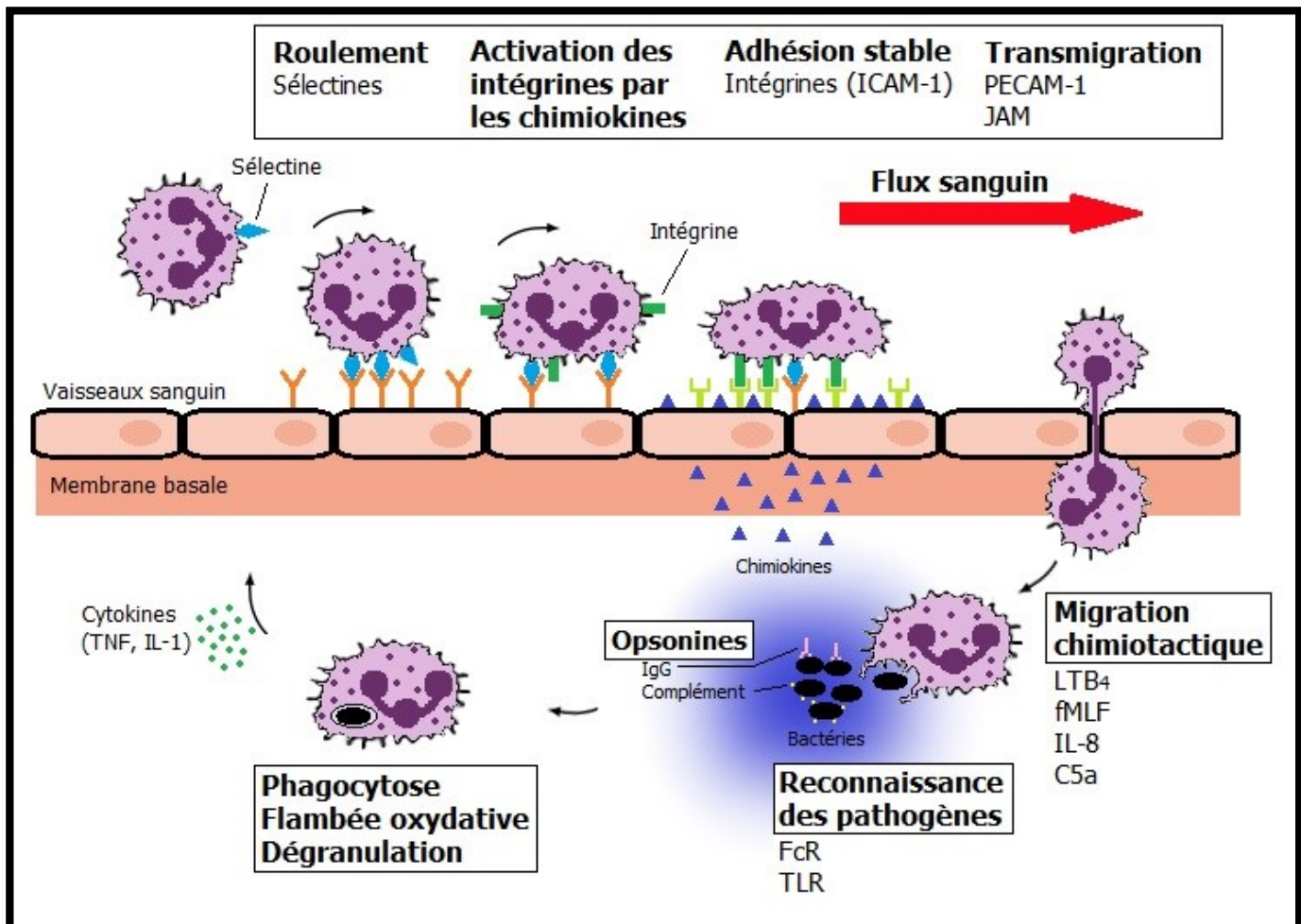


Figure 1 : Modèle de la cascade de migration des PMN vers le site inflammatoire dans un contexte infectieux. Adaptation libre tirée de : (Mayadas *et al.*, 1992). Afin de pouvoir éliminer les bactéries dans le tissu, les PMN doivent préalablement être ralentis et rouler le long de l'endothélium dans le flux sanguin par la liaison faible de sélectines dont l'expression augmente en réponse à des stimuli inflammatoires (e.g. TNF, IL-1). L'exposition des PMN aux chemoattractants permet d'activer les intégrines (e.g. ICAM-1) et de stabiliser leur adhésion ferme à la surface de l'endothélium. Grâce à l'interaction de molécules d'adhésion jonctionnelle (PECAM-1, JAM), les PMN vont s'insinuer entre les cellules endothéliales des capillaires sanguins et migrer vers le site d'infection grâce à un gradient chimiotactique (e.g. LTB₄, fMLF, IL-8, C5a). La reconnaissance des pathogènes (e.g. via TLR) qui peut

être facilitée par la fixation d'opsonines (IgG, molécules du complément) va initier les fonctions effectrices des PMN (phagocytose, flambée oxydative, dégranulation) et la libération de cytokines nécessaire au recrutement massif de PMN et autres cellules immunitaires. TNF : *Tumor Necrosis Factor*; IL-1 : Interleukine-1; ICAM-1 : *Intercellular Adhesion Molecule-1* ; PECAM-1: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* ; JAM : *Junctional Adhesion molecule* ; LTB₄ : Leucotriène B₄ ; fMLF : Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine ; IL-8 : Interleukine-8 ; C5a : *Complement component 5*.

1.3 Réponses effectrices des neutrophiles lors d'une infection

1.3.1 Dégranulation

Les PMN contiennent un arsenal de molécules antimicrobiennes contenues dans des granules qui doivent être acheminées à travers la circulation sanguine et correctement libérées jusqu'au site d'infection au moment opportun. Si le recrutement de ces cellules n'est pas adéquatement contrôlé, le contenu des granules peut occasionner des dommages tissulaires chez l'hôte. Il existe approximativement 300 protéines chez les PMN classifiées en trois principaux types de granules, soient primaires (ou azurophiliques), secondaires (ou spécifiques) et tertiaires (ou gélatinases) (Mayadas *et al.*, 2014). Ayant le diamètre le plus grand, les granules primaires sont les premières formées lors de la maturation des PMN et contiennent de la myéloperoxydase (MPO), une enzyme clé dans la flambée oxydative. On y retrouve également des défensines, des lysosymes, des protéines antimicrobiennes augmentant la perméabilité bactérienne (BPI) et de nombreuses protéases sérines. Les granules secondaires, de plus petit diamètre, sont caractérisés par la présence de la lactoferrine, une glycoprotéine. On y retrouve également la PTX3 que seuls les PMN ont en réserve dans ce type de granule, comparativement aux macrophages et cellules endothéliales. Les granules tertiaires, de taille davantage inférieure, sont une réserve pour plusieurs métalloprotéases comme la gélatinase et la leucolysine. Enfin, les vésicules sécrétoires, considérées comme la quatrième famille de granules, sont issues de l'endocytose de la membrane plasmique lors du stade tardif de la maturation des PMN et rapidement mobilisées. Elles contiennent différentes molécules plasmatiques comme l'albumine et de protéines liées à la membrane nécessaires à la migration des PMN. Non seulement, les granules peuvent être acheminés à la membrane plasmique où ils agissent à titre de ligands au cours de la migration, mais aussi sécrétés dans le milieu extracellulaire du site d'infection afin de cibler des pathogènes (par opsonisation ou élimination), ou bien

dans les phagosomes où ils participent à la lyse des pathogènes. Les granules azurophiliques, par exemple l'azurocidine, ont la propriété d'être des chimioattractants directs pour les phagocytes mononucléaires et les granulocytes (Soehnlein et Lindbom, 2009). La cathepsine G convertit notamment la prochémérine, un chimioattractant faible, en chémérine qui est un puissant chimioattractant pour les granulocytes (Wittamer *et al.*, 2005). Les protéines des granules primaires comme la protéinase 3 (PR3) et secondaires telle la PTX3, favoriser l'élimination de certains pathogènes et participent en plus au recrutement cellulaire vers le site d'infection. En effet, la PTX3 peut augmenter la phagocytose chez les PMN en opsonisant certains pathogènes et les cellules apoptotiques, et activer le complément (Soehnlein *et al.*, 2009; Amulic *et al.*, 2012). La création d'un phagosome implique l'initiation de la flambée oxydative et la mobilisation des granules primaires et secondaires. Ces granules peuvent être fusionnés soit au phagosome, soit à la membrane cytoplasmique pour exposer ses composés antimicrobiens dans le tissu. La fusion des granules secondaires est particulièrement importante, puisque qu'un composé nécessaire à l'assemblage du complexe de la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) oxydase, la flavocytochrome b558, y réside. La production de ROS dans le phagosome et le milieu extracellulaire dépend de cette fusion.

Les PMN produisent également des récepteurs et molécules nécessaires au maintien de l'homéostasie de leur environnement chez l'hôte comme le récepteur à la HPx et l'HO-1 (Freitas *et al.*, 2006; Spiller *et al.*, 2011). Produite dans le foie, l'HPx est une glycoprotéine plasmatique ayant la plus forte affinité à l'hème libre extracellulaire issu de la lyse des globules rouges. L'hème est potentiellement très toxique en raison de sa capacité à s'insérer entre les lipides membranaires et produire des radicaux hydroxyles. Le complexe hème/HPx qui induit un changement de conformation permettant la translocation et la liaison de celui-ci à son récepteur spécifique (nommé CD91 ou LRP-1) qui est une « *LDL-related protein* » exprimée fortement à la surface des PMN. Il en résultera une endocytose de ce complexe dans les PMN afin de dégrader l'hème (Tolosano et Altruda, 2002). L'HO-1 est l'enzyme qui catalyse la dégradation de l'hème dont les produits sont le CO, la biliverdine et le Fe²⁺ (Takahashi *et al.*, 2006). Elle est donc une enzyme ayant une puissante activité anti-oxydante et cytoprotective, principalement exprimée dans les PMN

du foie. Le stress oxydatif, l'exposition aux endotoxines, aux cytokines, au NO, à l'hème et aux métaux lourds, sont tous des facteurs pouvant induire l'HO-1.

1.3.2 Phagocytose

Lorsque qu'ils sont introduits dans la barrière endothéliale et ont migrés jusqu'au site d'infection dans le tissu de l'hôte, les PMN ont la capacité d'engouffrer des organismes cibles ou des particules. Ce mécanisme, nommé la phagocytose, est la principale arme des PMN pour éliminer les bactéries, les champignons, les virus, les débris et les cellules apoptotiques ou en nécrose dans l'ordre de secondes (Segal *et al.*, 1980). Ce processus, actif et initié par la liaison de récepteurs cibles, consiste à internaliser une particule par la membrane cytoplasmique via un réarrangement du cytosquelette, laquelle formera une vacuole, le phagosome (Nordenfelt et Tapper, 2011).

1.3.2.1 Reconnaissance des pathogènes

Dans un premier temps, les PMN doivent reconnaître des pathogènes ou des composants microbiens pour être en mesure de s'adhérer à ceux-ci avant de les ingérer. À la surface de leur membrane cytoplasmique, les PMN possèdent deux différents types de récepteurs impliqués dans la phagocytose : les récepteurs à opsonines et les récepteurs reconnaissant directement des motifs bactériens (Amulic *et al.*, 2012). Afin de faciliter l'élimination des pathogènes ou des cellules apoptotiques par les macrophages, les PMN peuvent reconnaître des protéines du sérum (opsonines). Celles-ci désignent les anticorps (la fraction Fc) et certains fragments du complément comme C3 et C5 qui se lient aux antigènes de la surface des pathogènes au cours de l'activation du complément. Elles seront reconnues notamment par les récepteurs Fc et les récepteurs du complément des PMN. Or, ces derniers peuvent reconnaître, entre autres, directement des motifs moléculaires caractéristiques aux pathogènes (PAMP) via la reconnaissance de motifs moléculaires par les PRR (*Pathogen Recognition Receptors*). Il y a essentiellement trois catégories de PRR : sécrétés (PTX3 et CRP), membranaires (récepteurs *toll-like* (TLR) et lectine type-C) et cytoplasmiques (récepteurs *NOD-like* et *RIG-I-like*) (Futosi *et al.*, 2013). Parmi les PRR membranaires, les TLR semblent fonctionner exclusivement comme récepteurs de signalisation et jouent un rôle clé en permettant le déclenchement de l'immunité adaptative.

1.3.2.1.1 Récepteurs Fc

Les récepteurs Fc (FcR) membranaires à haute affinité pour les immunoglobulines G (IgG) sont exprimés non seulement sur les PMN, mais également sur les monocytes, les macrophages, les éosinophiles, les mastocytes, les cellules B, les cellules NK (*natural killer*) et les plaquettes (Akerley *et al.*, 1991). Ils se lient à la région Fc des immunoglobulines, lesquelles définissent le type de récepteur : IgA lie les récepteurs Fc α , IgE lie les récepteurs Fc ϵ , IgG lie les récepteurs Fc γ et IgM lie les récepteurs Fc μ . Le principal type de FcR impliqué dans l'induction de la phagocytose par des pathogènes opsonisés est le Fc γ R.

Il existe 6 types de Fc γ R qui ont été identifiés chez l'humain : Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32a), Fc γ RIIB (CD32b), Fc γ RIIC (CD32c), Fc γ RIIIA (CD16a) et Fc γ RIIIB (CD16b). Malgré la variation de l'affinité et de l'avidité des IgG avec les Fc γ R, la cascade de signalisation subséquente via le motif d'activation de l'immunorécepteur dépendant de la tyrosine, ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), reste tout de même similaire. L'activation de Fc γ R déclenche l'oligomérisation des immunorécepteurs à motif ITAM, ce qui rapproche le récepteur d'une tyrosine kinase appartenant à la famille Src ancrée dans la membrane cytoplasmique. La kinase Src phosphoryle les tyrosines d'ITAM, ce qui va entraîner le recrutement de Syk (*Spleen tyrosine kinase*) ou ZAP-70 qui vont être à leur tour phosphorylés et activés par la kinase Src. Ceci va permettre d'activer plusieurs voies de signalisation, notamment PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) et SOS (*Son of sevenless homologues*). SYK est également impliqué au niveau de la modulation du réseau d'actine qui est essentielle dans l'engouffrement des pathogènes (Stuart et Ezekowitz, 2005). Ces différentes voies de signalisation assurent non seulement l'induction effectrice de la phagocytose, mais aussi de la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires via la liaison d'une particule opsonisée à Fc γ R.

Le Fc γ RI (CD64) à haute affinité pour les IgG1 et IgG3 est reconnu comme un marqueur inflammatoire important, puisque qu'il est physiologiquement peu exprimé chez les PMN au repos contrairement en présence de conditions inflammatoires. Fc γ RIIa (CD32), Fc γ RIIb (CD16) et Fc γ RIV sont quant à eux exprimés constitutivement chez les

PMN. Cette augmentation transitoire et rapide (de l'ordre de 4 h) de CD64 peut être induite soit par la liaison des PMN de composés membranaires bactériens tels que le LPS et le peptidoglycane, par des cytokines comme IFN- γ ou par des particules opsonisées du complément (Danikas *et al.*, 2008). Chez des PMN normaux *in vitro* comme *in vivo*, il en résultera une augmentation de leurs fonctions, telles que la phagocytose et la production de ROS. Lorsque l'infection sera résorbée, l'expression de CD64 reviendra à la normale approximativement après 5 jours (Kerst *et al.*, 1993).

1.3.2.1.2 Récepteurs Toll-like

Les TLR ont un rôle crucial dans la reconnaissance de pathogènes et semblent n'être impliqués que dans la production de cytokines en réponse aux pathogènes, sans avoir de rôle direct dans l'adhésion et la phagocytose de ceux-ci. La famille des récepteurs TLR comptent une dizaine de membres, dont une partie reconnaît les motifs de pathogènes extracellulaires (TLR1, 2, 4, 5, 6) et l'autre les motifs de pathogènes intracellulaires (TLR3, 7, 8, 9). L'activation des TLR par les PAMPs initie une cascade moléculaire intracellulaire incluant notamment MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) et le groupe IRAK (*IL1-R-associated serine kinase*) qui va conduire à l'activation subséquente du facteur de transcription NF- κ B. Il en résultera de la sécrétion d'une variété de cytokines inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-12 et le TNF α (Medzhitov, 2001). La stimulation des TLR augmente également la capacité phagocytaire et ralentit l'apoptose des PMN (Parker *et al.*, 2005).

Ils jouent également un rôle au niveau des récepteurs GPCR en désensibilisant les PMN aux chimiokines. L'internalisation des récepteurs aux chimiokines comme le CXCR2 permet de contrôler la durée de l'activation afin d'éviter les effets néfastes qu'une stimulation prolongée du récepteur pourrait produire. Les ligands de TLR2, comme l'acide lipotéichoïque et le peptidoglycane exprimés par les bactéries Gram-positives, et de TLR4 tel que le LPS exprimé par les bactéries Gram-négatives, peuvent augmenter l'expression d'un type de récepteurs couplés à la protéine G (GPCR), le GRK2 (*G protein-coupled receptor kinase-2*). Le GRK2 agit à titre d'inhibiteur de la migration des PMN en désensibilisant l'action des chimiokines CXCL2 et CXCL8. Celles-ci sont produites

notamment par les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales au site d'infection.

1.3.2.1.3 Axe IL-33/ST2

L'axe IL-33/ST2 joue un rôle crucial au niveau de différents types d'infections chez l'humain et les animaux. Dépendamment du contexte de l'infection (l'organe impliqué, le microenvironnement de cytokines, le type et la sévérité de la maladie infectieuse), l'axe IL-33/ST2 peut jouer un rôle à double tranchant. Son rôle est d'un part protecteur contre le choc septique (LPS), le virus de l'influenza ou la péritonite (*C. albicans*) et d'autre part, excessif dans l'asthme fongique (*A. alternata*), l'infection pulmonaire (*S. mansoni*, *N. brasiliensis*) ou l'infection intestinale (*T. muris*, *T. spiralis*) (Rostan *et al.*, 2015).

L'IL-33, libéré par les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales, ainsi que les mastocytes et d'autres cellules immunitaires en réponse à une infection, est un membre identifié récemment appartenant à la famille des cytokines IL-1. Le récepteur spécifique d'IL-33, ST2, va former un complexe hétérodimérique en recrutant d'IL-1RAP (*IL-1 receptor accessory protein*) suite à la reconnaissance de son ligand. Dans un contexte d'infection virale, la voie de signalisation d'IL-33 prévient la désensibilisation des récepteurs impliqués dans le chimiotactisme des PMN induite par l'activation de GRK2 via les TLR et active la voie de signalisation de NF- κ B. Il existe également un isoforme soluble du récepteur ST2, nommé sST2, qui agit à titre de leurre et peut moduler la migration des PMN (Alves-Filho *et al.*, 2010; Roger & Calandra, 2010; Rostan *et al.*, 2015). Il est décrit dans l'étude de Le *et al.* qu'IL-33 peut agir sur l'activité antifongique des PMN (Le *et al.*, 2012). En effet, IL-33 augmente l'activité phagocytaire des PMN pour les *C. albicans* opsonisés. Il favorise également la myélopoïèse dans la moelle osseuse, induit rapidement la libération des PMN de la moelle osseuse dans la circulation sanguine via l'augmentation de la production de CXCL1-2 par les macrophages dans les tissus en réponse à une infection fongique.

1.3.2.1.4 Récepteurs CD66

Comme il a été mentionné précédemment, le mécanisme par lequel les PMN éliminent les pathogènes est un processus complexe qui nécessite la production de chimiokines, le roulement, l'adhésion et la migration des cellules jusqu'au site d'infection. Dans le but de pouvoir interagir aux sélectines à la surface endothéliale des vaisseaux sanguins, les PMN expriment certains récepteurs comme le CD66b dont l'expression augmente en condition inflammatoire et qui est aussi impliqué dans la phagocytose et la production de ROS de ceux-ci (Ducker et Skubitz, 1992; Torsteinsdóttir *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2014). Les antigènes CD66 sont des membres de la famille d'antigènes carcino-embryonnaires (ACE), laquelle est une partie intégrante de la superfamille d'IgG (Nagel et Grunert, 1995). On y compte 4 types de récepteurs CD66 qui sont exprimés à la surface des PMN chez l'humain : CD66a, CD66b, CD66c et CD66d (Skubitz *et al.*, 1996). Les structures de CD66a et CD66d sont transmembranaires avec une terminaison cytoplasmique, alors que celles de CD66b et CD66c sont ancrées dans la membrane des PMN via une molécule de glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les récepteurs CD66 comportent l'épitope CD15s qui permet aux PMN de se lier aux sélectines-E à la surface de l'endothélium (Kuijpers *et al.*, 1992). Une stimulation des CD66 peut également engendrer une augmentation de l'adhésion des PMN au fibrinogène via l'intégrine β_2 (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 1997). CD66a et CD66b peuvent aussi modifier l'adhésion de ces cellules à la laminine via la galectine-3 (Feuk-Lagerstedt *et al.*, 1999). Cette lectine augmente aussi l'adhésion des PMN à la fibronectine, même si elle ne se lie pas directement à celle-ci (Kuwabara et Liu, 1996). L'association entre les membres CD66 peut également causer l'augmentation de la production de ROS des PMN stimulés par du FMLF (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 1997). Ces récepteurs ont également la capacité d'activer les tyrosines kinases de la famille Src via leur terminaison cytoplasmique (Mayadas *et al.*, 2014). La phosphorylation de ces tyrosines est un point critique de la cascade de signalisation menant à la phagocytose des pathogènes par les PMN. Selon l'étude menée par Schmidt *et al.*, la diminution de l'activité phagocytaire des PMN est associée à la surexpression de CD66b suite à une infection causée par *Staphylococcus aureus*.

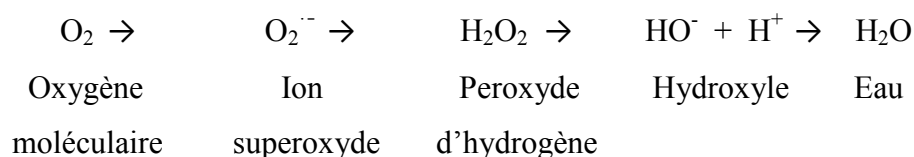
1.3.2.2 Formation du phagosome

Comme la surface des bactéries est plus hydrophobe que celle des PMN, ces derniers ont la propriété de modifier les caractéristiques de la surface à phagocyter. L'opsonisation soit par le complément ou les immunoglobulines spécifiques, permet de faciliter l'ingestion de particules en abaissant le nombre de charges de répulsion entre le phagocyte et le pathogène (Nordenfelt et Tapper, 2011). L'interaction des opsonines avec le phagocyte déclenche la polymérisation de l'actine dans le cytosol sous-jacent, menant à l'ingestion des particules. L'invagination de la membrane cytoplasmique forme alors le phagosome qui initiera à son tour l'élimination du pathogène par des substances microbicides. Celles-ci proviennent, entre autres, de la fusion des granules avec le phagosome et de la libération de ROS produits simultanément. Le phagosome sera alors mature au cours de ce processus. Le pH vacuolaire neutre est dû à l'intensité de la réponse de la flambée oxydative (Jankowski *et al.*, 2002). Il est possible que les récepteurs induisant la phagocytose soient activés par un complexe immun ou des larges particules et/ou surfaces opsonisées, et ce, même si le PMN ne peut pas l'engloutir complètement. Cette situation que l'on nomme « *frustrated phagocytosis* » va provoquer la libération du contenu granulaire ainsi que les produits issus de la flambée oxydative dans le milieu extracellulaire et occasionner des dommages tissulaires importants (Nordenfelt et Tapper, 2011).

1.3.3 Production de radicaux libres oxygénés

La flambée oxydative est le mécanisme par lequel sont produits les ROS à partir de la réduction de molécules d'oxygène en anions superoxydes (O_2^-) majoritairement chez les PMN (Amulic *et al.*, 2012). Les superoxydes peuvent former un large éventail de différentes espèces réactives en réagissant par exemple avec le NO, la MPO ou les superoxydes dismutases (SOD) (Gougerot-Pocidallo *et al.*, 2002). Les ROS sont des molécules hautement réactives qui s'attaquent aux protéines, aux phospholipides membranaires et aux acides nucléiques pour en altérer la fonction. Ces composés toxiques n'éliminent non seulement les pathogènes, mais peuvent également causer des dommages tissulaires importants s'ils sont libérés en grande quantité dans le milieu extracellulaire. Comme il a été mentionné, la fusion des granules spécifiques avec la membrane plasmique ou le phagosome est un élément clé dans la production de ROS. Le réarrangement du

cytosquelette permet donc de transférer un composant, le flavocytochrome b558, au complexe enzymatique NADPH oxydase membranaire formé de 5 sous-unités, ce qui permettra de produire des ROS autant dans le phagosome que dans le milieu extracellulaire (Sheppard *et al.*, 2005). Différents types de ROS sont générés par la formation d'intermédiaires d'espèces réactives au cours de la réduction de molécules d'oxygène en eau :



Les ions superoxydes et les hydroxyles ont des propriétés hautement réactives et potentiellement toxiques, puisque que ce sont des radicaux libres qui possèdent un atome ou une molécule qui a un ou plusieurs électron(s) non apparié(s). La conversion de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène requiert une enzyme, la SOD. Différents autres systèmes de défense antioxydants sont indispensables au maintien de l'intégralité des PMN et des cellules avoisinantes (catalase, protéine Bcl2, glutathion) (Hockenbery *et al.*, 1993).

L'élimination des pathogènes dans le phagosome suite à leur phagocytose permet de limiter les dommages tissulaires dans un espace clos. L'activité de ce complexe augmente considérablement lorsque les PMN sont activés par un médiateur pro-inflammatoire, pouvant atteindre des valeurs frôlant les 360 nmol de ROS par heure. Dans le cas contraire, cette concentration est peu significative, voire quasi nulle, sans stimulation (Tauber et Babior, 1977). Les PMN présentent une activité phagocytaire plus rapide ainsi qu'une production de ROS plus intense comparativement aux macrophages (Nordenfelt et Tapper, 2011). Outre les rôles directs antimicrobiens, les ROS sont également impliqués dans la signalisation cellulaire au niveau de la régulation de nombreuses cibles (phosphatases, métalloprotéinases et caspases) en oxydant directement les résidus de cystéine. Les protéases contenues dans les granules peuvent aussi être régulées directement par oxydation ou par l'inactivation de leurs inhibiteurs (Shao *et al.*, 2005).

1.3.4 Captation de dérivés bactériens

Non seulement les PMN peuvent éliminer des pathogènes par phagocytose, mais ils peuvent également capter des dérivés bactériens en produisant des NETs. Ce processus nommé, la NETosis, est une forme de mort cellulaire programmée. Son mode d'action consiste à projeter dans le milieu extracellulaire une structure fibreuse composée de chromatine décondensée à la manière d'un filet afin d'augmenter la surface de contact possible avec les pathogènes. Celle-ci contient aussi des histones et des protéines antimicrobiennes provenant des granules et du cytoplasme. Les PMN peuvent alors faciliter leur reconnaissance par les phagocytes et neutraliser des pathogènes en exposant ceux-ci à une forte concentration locale d'agents antimicrobiens (Amulic *et al.*, 2012; Knight *et al.*, 2012).

1.3.5 Production de médiateurs inflammatoires

Comme les PMN sont les premières cellules à migrer au site d'infection, celles-ci jouent un rôle primordial en orchestrant la suite de la réponse immunitaire en recrutant d'autres cellules immunitaires (Cassatella, 1995). Ils vont produire de faibles quantités par cellule de cytokines inflammatoires (e.g. IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-10, TNF α , IL-8) et de médiateurs lipidiques (e.g. LTB₄), mais qui vont favoriser le maintien et l'amplification de la réponse inflammatoire de par leur nombre au site d'infection. Lors de la résolution de l'inflammation, des médiateurs anti-inflammatoires seront libérés afin de favoriser le retour à l'homéostasie de l'organisme.

Dans la famille de l'IL-1, l'IL-1, l'IL-1 β et l'IL-1RA affectent presque tous les types cellulaires en combinaison avec d'autres cytokines ou messagers (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Unique à leur famille, les actions d'IL-1 α et β sont modulées par l'IL-1RA. Ce dernier peut agir comme un antagoniste en liant les mêmes récepteurs qu'IL-1, mais sans déclencher de signalisation intracellulaire. Le TNF α peut être produits par différents types cellulaires, mais les monocytes/macrophages en sont la principale source. La plupart des cellules répondent à son signal en exprimant les récepteurs de cette cytokine, p55 et p65. Les effets de la réponse engendrée par cette cytokine peuvent être modulés par le clivage et la libération de ses récepteurs dans le milieu extracellulaire qui vont la capter et empêcher

sa liaison à la surface des cellules. Le TNF α déclenche une cascade de signalisation chez les cellules activées qui va mener à l'expression de molécules d'adhésion, l'induction de la dégranulation et de l'explosion oxydative et la production d'autres médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1, la prostaglandine (PG) I₂ et E₂. La cytokine produite la plus abondante chez les PMN, l'IL-8 (ou CXCL8), a comme rôle principal de recruter d'autres PMN (Gainet *et al.*, 1998). Elle induit une migration dirigée, un changement de conformation, une dégranulation et une flambée oxydative. Son effet chimioattractant peut durer jusqu'à 10 heures.

Les granules des PMN contiennent aussi des médiateurs lipidiques préformés sous l'action d'enzymes à partir de phospholipides membranaires issus du métabolisme de l'acide arachidonique, nommés les éicosanoïdes (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Les principaux éicosanoïdes produits et rapidement libérés par les PMN sont le LTB₄, la PGE₂ et le thromboxane (TX) A₂. Les PMN sont les principaux producteurs de LTB₄. Ce dernier est reconnu comme étant un activateur efficace et surtout un puissant chimioattractant. Il peut cependant avoir d'autres effets comme l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'adhésion aux cellules endothéliales. Une concentration aussi peu que 10⁻¹⁰ M suffit pour déclencher le chimiotactisme des PMN et permettre leur déplacement vers le site inflammatoire. Les médiateurs lipidiques peuvent être induits par différentes activations membranaires : les complexes d'immunoglobulines de surface, la dégranulation, l'activation des récepteurs de cytokines, etc.

Les PMN recrutés sont sensibles au large éventail de stimuli véhiculés dans leur environnement de par leur production constitutive de cytokines, de chimiokines et de médiateurs lipidiques, ainsi que les médiateurs libérés dans le foyer d'infection. Les PMN peuvent donc influencer et amplifier la réaction inflammatoire (Amulic *et al.*, 2012) (Fig. 2).

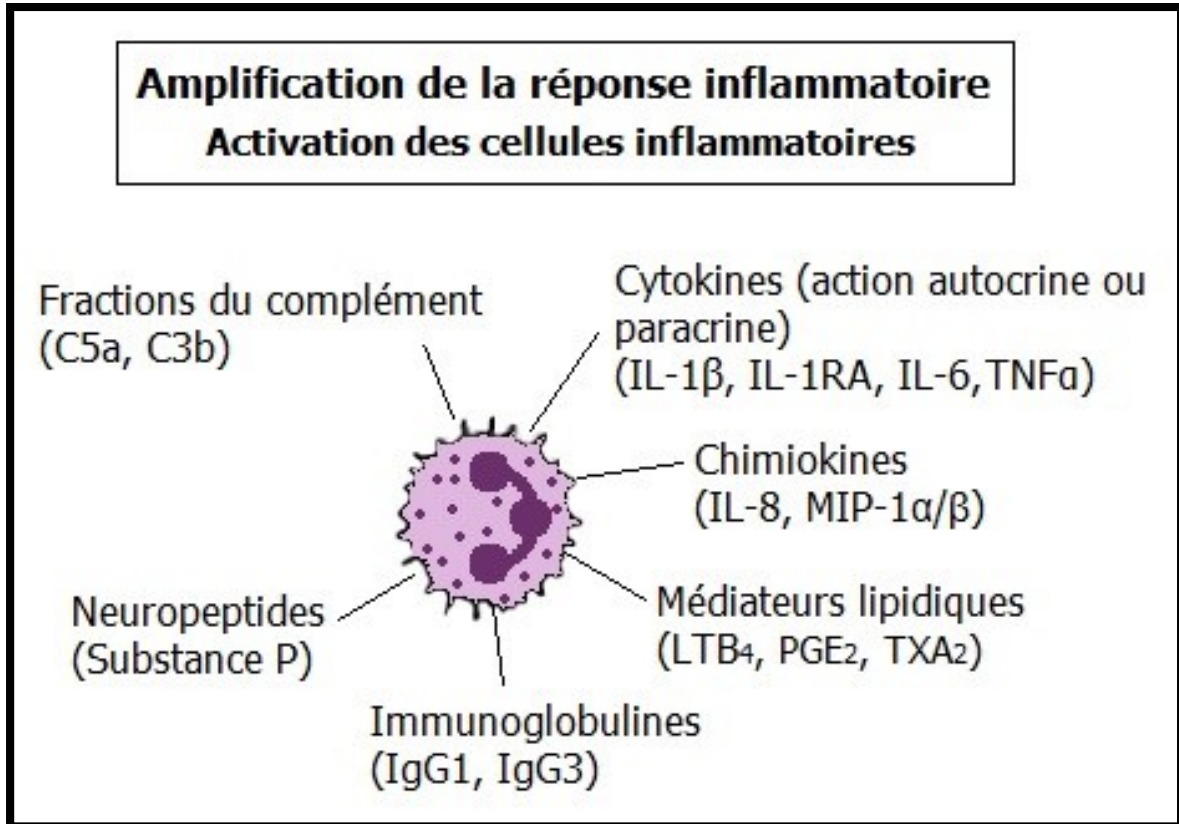


Figure 2. Activation des PMN et amplification schématisée de la réponse inflammatoire. Adaptation libre tirée de : (Prin *et al.*, 2012). Les PMN localisés au site inflammatoire produisent et sont exposés à différents types de médiateurs inflammatoires dont le rôle est crucial dans le maintien et l'amplification de la réponse inflammatoire et le recrutement des autres cellules immunitaires.

Ils peuvent avoir un impact sur d'autres PMN environnants, mais aussi sur les cellules mononucléées (monocytes et lymphocytes), les plaquettes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les chondrocytes et d'autres types cellulaires (Cassatella, 1995; Parham *et al.*, 2011). Bien que les fonctions effectrices des PMN jouent en effet un rôle majeur à la première ligne de défense de l'organisme, cette production de médiateurs inflammatoires l'est d'autant plus afin de permettre la mise en place de l'immunité acquise.

1.4 Résolution de l'inflammation

Le déploiement des PMN doit être méticuleusement contrôlé étant donné que leur action antimicrobienne n'est pas seulement nocive pour les pathogènes, mais peut également l'être pour les cellules de l'hôte. La résolution de l'inflammation est un

processus par lequel l'infiltration des leucocytes est limitée et permet de retirer les cellules apoptotiques du site inflammatoire. L'échec de ce processus est la cause de nombreuses maladies inflammatoires sévères comme le sepsis, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), la fibrose kystique et l'arthrite rhumatoïde (Amulic *et al.*, 2012; Mayadas *et al.*, 2014). Les PMN sont alors exposés à différents médiateurs anti-inflammatoires (cytokines, médiateurs lipidiques) afin de diminuer l'inflammation. Parmi les médiateurs lipidiques, les lipoxines (LX) et les résolvines (RV) jouent un rôle clé dans l'arrêt du recrutement et de l'infiltration des PMN au site inflammatoire. Les LX proviennent entre autres du métabolisme de l'acide arachidonique impliquant plusieurs lipoxygénases chez différents types cellulaires (macrophages, monocytes et cellules épithéliales) et sont contrôlées par des cytokines telles qu'IL-4 et IL-13. Les RV sont quant à eux des composés trihydroxylés dérivés des oméga-3. Les LX comme les RV agissent notamment au niveau de la régulation des fonctions des PMN (diminution de la migration et de la production de médiateurs pro-inflammatoires). De plus, les RV stimulent activement la résolution de l'inflammation en augmentant la phagocytose par les macrophages et les PMN (bactéries et cellules apoptotiques), la production de NO et d'IL-1RA, ainsi que l'induction de l'HO-1 (Levy *et al.*, 2001; Serhan *et al.*, 2015).

1.4.1 Apoptose

Au terme de la courte vie des PMN matures, l'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est l'élément central de la résolution de l'inflammation et le mécanisme par lequel les cellules sénescents ou dysfonctionnelles sont normalement éliminées. Ce processus a pour but d'empêcher la nécrose précoce des cellules. Celle-ci implique une rupture de la membrane cellulaire, et donc, provoque la libération du contenu granulaire et de ROS causant des dommages tissulaires et de l'inflammation nocifs pour les cellules saines avoisinantes dû aux enzymes protéolytiques. De cette façon, les cellules apoptotiques précoces envoient des signaux aux macrophages afin d'être éliminées, réduisant ainsi le nombre de PMN présents au site d'infection (Fadok *et al.*, 1998; Amulic *et al.*, 2012). Ces signaux se traduisent soit par une altération de l'organisation des phosphatidylsérines membranaires normalement localisés sur la surface cytoplasmique (Kennedy et DeLeo, 2009), une perte d'acide sialique en surface permettant ainsi d'exposer

des glycanes (résidus galactose en majorité) (Varki et Gagneux, 2012) ou une perte des thrombospodines qui sont des glycoprotéines extracellulaires (Murphy *et al.*, 1998). Une fois que les cellules apoptotiques ont été phagocytées, la production de cytokines anti-inflammatoires telles que TGF β et IL-10 est induite chez les macrophages.

L'apoptose peut être induite par trois voies de signalisation distinctes nommées les voies extrinsèque et intrinsèque, ainsi que celle induite par un stress au réticulum endoplasmique (RE) qui est opérationnelle chez les PMN humains et identifiée plus récemment (Kennedy et DeLeo, 2009; Binet *et al.*, 2010). La voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose est initiée par la liaison de protéines extracellulaires aux récepteurs membranaires dans laquelle sont impliquées plusieurs molécules différentes comme le TNF, TRAIL (*Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) et FAS (*Apoptosis Stimulating Fragment*). L'activation de ces récepteurs permet le recrutement à la membrane plasmique de la protéine FADD (*Fas-associated protein with death domain*) qui est à la tête d'une cascade de signalisation menant à l'activation de la caspase-3, une enzyme exécutive de l'apoptose (Wesche *et al.*, 2005). La voie intrinsèque est induite par les ROS, les radiations γ ou des dommages à l'ADN qui régulent l'activation de plusieurs protéines pro-apoptotiques comme Bim (*BCL-2-like protein 11*), Bax (*BCL-2-like protein 4*) et PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*). Ces protéines agissent sur la libération de cytochrome *c* mitochondrial. À la suite d'une série d'événements, la caspase-9 permettra d'activer la caspase-3 comme dans la signalisation extrinsèque. Dans le but de maintenir la conformation active de protéines et de prévenir la formation d'agrégations dus à des conformations intermédiaires, une forte concentration de molécules chaperonnes est présente dans le RE. Toutefois, la formation d'agrégats de protéines n'ayant pas une conformation active peut se produire à cause du stress cellulaire ou à des conditions cytotoxiques que l'on nomme le stress au RE. Les PMN vont alors initier une réponse cytoprotectrice, l'UPR (*unfolded protein response*), en activant un ensemble de voies de signalisation provenant du RE en réponse à un stress. L'initiation de l'UPR a pour rôle d'atténuer la translation, favoriser le repliement, la sécrétion et la dégradation des protéines. Cependant, ce mécanisme peut s'avérer délétère pour les PMN si son action est excessive

ou se prolonge indûment et conduire au déclenchement de l'apoptose via les mécanismes indépendants ou dépendants des mitochondries (Binet *et al.*, 2010).

1.4.2 Devenir des neutrophiles

Le paradigme de la migration unidirectionnelle des PMN se terminant ultimement par le processus d'apoptose et de leur élimination par les macrophages afin de restaurer l'homéostasie des tissus, a été récemment remis en question (Hamza *et al.*, 2014). Une étude *in vivo* a démontré que les PMN peuvent retourner dans la circulation (Mathias *et al.*, 2006). Ce retour n'impliquant que des PMN activés ne serait pas dépendant de la nature du chimioattractant, ni de sa concentration (Hamza *et al.*, 2014). Les PMN peuvent également se différencier en cellules dendritiques (DCs) et lorsqu'exposés au GM-CSF, ils se différencient en un hybride possédant des propriétés des deux types cellulaires (marqueurs de DCs : CD11c, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-II), CD86) dont des marqueurs spécifiques de cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) (CD64, CD83) (Matsushima *et al.*, 2013). Les PMN sont aussi aptes à se différencier également en d'autres types cellulaires tels que les macrophages (Matsushima *et al.*, 2013; Köffel *et al.*, 2014).

CHAPITRE 2

Le sepsis

Le sepsis sévère et le choc septique sont la première cause de décès des patients aux unités de soins intensifs (ICU) non coronariens. Cela représente au CHUS (Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke) près de 200 cas/année en 2009 avec une mortalité de 31% à 28 jours (Lesur *et al.*, 2012). À l'intérieur du RUIS (Réseau universitaire intégré de santé) de l'Université de Sherbrooke, 50 cas supplémentaires s'ajoute chaque année au CHUS depuis 2005. Même si la mortalité à 28 jours a diminué selon une étude épidémiologique de 20 ans menée par Martin *et al.* avec le progrès de la prise en charge du sepsis (identification plus précoce du sepsis et amélioration des traitements de support), l'incidence de celui-ci ne cesse d'augmenter chaque année atteignant 10 à 30% des admissions aux ICU (Martin *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2012). Cette croissance est attribuée, entre autres, à la résistance microbienne aux antibiotiques, l'augmentation du vieillissement de la population, l'utilisation massive de thérapies immunosuppressives ainsi qu'aux interventions médicales complexes et invasives (Iskander *et al.*, 2013).

Les CS sont utilisés fréquemment dans le traitement du sepsis sévère et du choc septique, bien que leurs impacts rapportés sur le pronostic du sepsis soient variables et parfois controversés (Rossi *et al.*, 2009). C'est pourquoi il est nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les effets de ce type de traitement, en particulier sur les PMN qui ont un rôle à double tranchant dans le sepsis, soit dans la défense immédiate contre les infections et les défaillances organiques associées ou en affectant le pronostic (Alves-Filho *et al.*, 2008). Des indications d'administration de CS pourraient alors être envisagées pour la prise en charge de patients en sepsis grave présentant une dysfonction neutrophilique.

2.1 Le sepsis

2.1.1 Définition du sepsis

La définition du sepsis a été décrite de nombreuses façons, mais ce n'est que récemment qu'on a émis une définition claire des symptômes permettant de caractériser les

différentes étapes de la progression du sepsis. Ces critères ont été établis au cours de la conférence consensus de l'ACCP/CCM (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine) et sont présentés dans le Tableau 1 (Bone *et al.*, 1992).

Tableau 1. Critères de diagnostic du sepsis, sepsis sévère et choc septique.

SRIS ou SIRS	<ul style="list-style-type: none"> • Température corporelle altérée (< 36 ou > 38°C) • Tachycardie (> 90 battements/min) • Leucocytose (< 4000 ou > 12,000 cellules/mm³) • Tachypnée (> 20 respirations/min)
Sepsis	<ul style="list-style-type: none"> • Probablement ou certainement accompagné d'une infection • 2 critères minimum du SRIS
Sepsis sévère	<ul style="list-style-type: none"> • Défaillance organique ≥ 1 <ul style="list-style-type: none"> ○ Cardiovasculaire ○ Rénale ○ Respiratoire ○ Hépatique ○ Hématologique ○ SNC ○ Acidose métabolique inexpliquée
Choc septique	<ul style="list-style-type: none"> • Sepsis sévère et hypotension réfractaire • Accumulation de dysfonctions d'organes ≥ 1: MOF

Traduction libre tirée de : (Bone *et al.*, 1992). SRIS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique ; SIRS : *Systemic Inflammatory Response Syndrome* ; MOF : *Multiple Organ Failure*.

La sévérité de la maladie peut être classifiée selon un des systèmes de score aux UFC, le score APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*), afin de prédire les risques de mortalité (Knaus *et al.*, 1985). Ce score, pouvant varier de 0 à 71, est déterminé dans les premiers 24 heures suivant l'admission d'un patient selon l'âge et une douzaine de mesures physiologiques. Plus le score est élevé, plus la maladie est sévère avec un risque élevé de mortalité.

2.1.2 Épidémiologie du sepsis

Plusieurs facteurs de risque pour les infections sévères sont bien établis dans la littérature et augmente la prédisposition au sepsis sévère et au choc septique comme l'âge,

le sexe et l'origine ethnique (Esper *et al.*, 2006; Iskander *et al.*, 2013). L'incidence du sepsis sévère est plus élevée chez les enfants et les personnes âgées (augmentation du vieillissement de la population), les hommes plutôt que les femmes et davantage chez les personnes noires que blanches (Angus *et al.*, 2001; Mayr *et al.*, 2010). Cependant, la prédisposition de la maladie liée au genre selon plusieurs études cliniques humaines demeure très variable et controversée (Schröder *et al.*, 2000; Adrie *et al.*, 2007; Combes *et al.*, 2009). Il est également connu que la comorbidité chez les patients est un facteur de risque important dans le pronostic du sepsis (Knaus *et al.*, 1992). Les maladies chroniques comme le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), la MPOC et plusieurs cancers ainsi que l'utilisation d'agents immunosuppresseurs augmentent les risques d'infection et précipitent le sepsis sévère et le choc septique (Angus *et al.*, 2001; Danai, 2006; Snelgrove *et al.*, 2010). Par conséquent, ces patients sont plus sujets aux infections nosocomiales et aux pathogènes résistants aux antibiotiques. Une étude épidémiologique du sepsis a démontré sur une période de 20 ans (1979-2000) que les infections gram-positives surpassaient celles gram-négatives (Martin *et al.*, 2003). Toutefois, cette tendance semble s'inverser selon une étude plus récente impliquant 14, 000 patients ICU dans laquelle 62% des infections étaient gram-négatives, 47% étant gram-positives et 19% fongiques (Vincent *et al.*, 2009). Il a été également démontré que la variabilité génétique a un impact sur l'incidence du sepsis (Chung et Waterer, 2011; Namath et Patterson, 2011). Ces études ont mis l'accent sur le polymorphisme de gènes codant pour des protéines et des cytokines impliqués dans la pathogenèse du sepsis. Cependant, comme les populations de patients sont fréquemment hétérogènes dû à la difficulté de classification, les résultats de ces études restent controversés (Chung et Waterer, 2011; Namath et Patterson, 2011). Autre que les facteurs liés à la population qui augmentent l'incidence du sepsis, certains sont liés au traitement comme l'utilisation d'instruments invasifs lorsque les patients sont intubés et les techniques de réanimation. De surcroît, les procédés chirurgicaux complexes sont un facteur de risque liés à l'incidence du sepsis (Angus *et al.*, 2001).

Bien que tous les types d'infection (bactérienne, virale et fongique) peuvent entraîner le sepsis, le foyer d'infection le plus fréquent chez les patients en sepsis sévère est respiratoire (44%) en raison de sa grande surface microvasculaire où les PMN peuvent

rester emprisonnés. Les infections non spécifiques (17,3%), génito-urinaires (9,1%) et abdominales (8,6%) demeurent les plus fréquentes après les infections pulmonaires (Angus *et al.*, 2001).

2.1.3 Conséquences cardiovasculaires et hématologiques

Au cours du sepsis, la défaillance vasculaire survient suite à une perturbation de l'homéostasie de la vasomotricité et de la coagulation. La modulation de la vasomotricité est associée à l'instabilité de l'endothélium qui se manifeste par une diminution de la réponse contractile aux catécholamines. La production de NO et de prostacycline par les cellules endothéliales sont les principaux responsables de l'hypotension dans le sepsis (Vincent *et al.*, 2000; Sharawy, 2014). L'hypotension résultant d'une vasodilatation diffuse est la conséquence la plus sévère du sepsis au niveau circulatoire. Il a été également décrit que la persistance de la vasodilatation pourrait être due au dysfonctionnement de la sécrétion compensatoire de la vasopressine (hormone antidiurétique) chez les patients septiques (Landry *et al.*, 1997). La vasodilatation n'est pas seulement responsable de l'hypotension subséquente : la redistribution des fluides due à une perturbation de la perméabilité endothéliale peut aussi être un facteur y contribuant. Les organes n'obtiennent donc pas un apport maximal d'oxygène dans le sepsis. Chez ces patients, la densité de leurs capillaires décroît considérablement, ce qui pourrait être dû à la compression de ces derniers par la formation d'œdème, au gonflement endothélial ou bien à leur obstruction causée par les leucocytes ou les érythrocytes (De Backer *et al.*, 2002).

On retrouve également des anomalies d'expression et de régulation de molécules d'adhésion des PMN, de la production de dérivés de l'acide arachidonique et de substances vasoconstrictrices (endothéline, thromboxane A₂, angiotensine II) et de l'équilibre pro- et anticoagulant (Hollenberg et Cunnion, 1994). Il a été largement décrit que l'état pro-coagulant est prédominant chez les patients septiques atteints gravement, ce qui mène à un dépôt inadéquat de fibrine intravasculaire, nommée coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (Fourrier *et al.*, 1992; Levi et van der Poll, 2010). Toutefois, la communauté scientifique se questionne si ce dysfonctionnement a un rôle pathogénique dans le sepsis ou en serait une conséquence. Lorsque l'équilibre naturel de la coagulation est perturbé durant

le sepsis, les petits caillots rapidement formés peuvent être disséminés et se loger dans la microcirculation des organes. Il se forme alors une obstruction des micro-vaisseaux, causant des lésions d'ischémie menant au dysfonctionnement multiple d'organes et ultimement à la mort. Comme les plaquettes et les facteurs de coagulation dont le fibrinogène sont épuisés plus rapidement que leur production, le temps de coagulation se retrouve prolongé chez les patients. Le processus de coagulation comprend trois molécules clés : la protéine C circulant sous forme inactive et activée en formant un complexe avec la thrombine, l'antithrombine III synthétisée par le foie et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire sécrété par l'endothélium. La protéine C activée (CRP) possède des propriétés profibrinolytiques, anticoagulantes et anti-inflammatoires. Chez les patients septiques, on note une diminution de la protéine C ainsi que l'inactivation de sa forme active, et de l'antithrombine III qui sont associées à la mortalité (Levi et van der Poll, 2010). Il serait donc simple d'imaginer que le problème peut être facilement contourné en prévenant la formation de caillots par l'usage d'anticoagulants. Cependant, en pratique, il y a plusieurs facteurs qui entrent en jeu comme l'hétérogénéité de la population, la comorbidité et les contradictions des soins thérapeutiques standards comme l'usage de l'héparine (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011).

Les lésions endothéliales peuvent être le résultat des interactions entre les cellules endothéliales, les PMN et autres cellules immunitaires suite à leur activation. Ces interactions induisent entre autres la sécrétion de ROS et d'enzymes protéolytiques provenant des granules des PMN, ainsi que d'agents vasoconstricteurs (PDGF, PAF) qui une fois dans le milieu extracellulaire peuvent causer des dommages tissulaires (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011). Enfin, la perte de la capacité des érythrocytes à se déformer dans la microcirculation est un autre facteur pouvant contribuer à l'ischémie des tissus dans le sepsis. Leur rigidité empêche une circulation adéquate dans les capillaires, ce qui rend le débit sanguin très irrégulier et diminue l'apport en oxygène aux tissus (Piagnerelli *et al.*, 2012).

La formation de microparticules (MP) endothéliales peut aussi contribuer aux effets délétères de l'inflammation causée par le sepsis (Matsumoto *et al.*, 2015). Les MP sont de

petites vésicules formées à partir de membrane pouvant appartenir à différents types cellulaires comme les plaquettes, les érythrocytes, les leucocytes, les monocytes et les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales, les monocytes et les leucocytes peuvent libérer des MP suite à leur activation soit par du LPS, des cytokines pro-inflammatoires, le complément ou les ROS (Boulanger *et al.*, 2006). Plus précisément, les cellules endothéliales activées, dont l'activité pro-coagulante est augmentée, contribuent à augmenter la production de MP qui se lieront aux leucocytes afin de les activer au cours du sepsis. Les MP endothéliales expriment des antigènes de surface spécifiques tels que le facteur tissulaire, la thrombomoduline, et le récepteur endothélial à la protéine C, lesquels auraient leur propre activité spécifique. Elles peuvent être impliquées dans les dommages tissulaires observés dans le sepsis, incluant la CIVD. La circulation étant perturbée, les MP contribuent au déséquilibre de la microcirculation, et ultimement au MOF (Reddy et Standiford, 2010; Matsumoto *et al.*, 2015).

2.2 Les traitements du sepsis sévère et du choc septique

2.2.1 Cibles thérapeutiques du sepsis sévère et choc septique

Au cours des 30 dernières années, le sepsis sévère et le choc septique ont été l'objet de nombreuses études dans le but d'identifier les facteurs responsables de la réponse de l'hôte face à une infection qui pourraient potentiellement servir de cibles thérapeutiques (Deans *et al.*, 2005). En dépit des progrès réalisés au niveau de l'antibiothérapie et de la prise en charge des défaillances des organes, aucune cible thérapeutique n'a permis l'amélioration efficace du pronostic du choc septique en phase clinique à ce jour. La réponse inflammatoire excessive de l'hôte et l'activation inappropriée de la cascade de la coagulation sont les cibles thérapeutiques visées dans le choc septique (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011; Wiersinga, 2011).

Selon plusieurs études, il est bien établi, autant chez des modèles animaux et humains, que la réponse inflammatoire joue un rôle actif dans le développement du choc septique. Les cytokines pro- et anti-inflammatoires, les protéines du complément et les marqueurs de PMN activés sont les types de biomarqueurs ciblés pour mieux diagnostiquer

la maladie. Des marqueurs globaux d'inflammation systémique, tels que la CRP et la procalcitonine (PCT) ont été étudiés extensivement pour déterminer la sévérité du sepsis et la progression de la maladie dans le but de prédire le pronostic (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011). La CRP, produite par les hépatocytes en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, augmente dans le plasma 4 à 6 h suivant l'initiation d'un dommage tissulaire. Elle peut continuer à augmenter jusqu'à atteindre des concentrations cent fois plus élevées dans les premiers 24 à 48 h (Pepys et Hirschfield, 2003). Ces niveaux restent élevés pendant la phase aiguë de l'inflammation et reviennent à la normale lors de la résolution du dommage tissulaire. D'autres biomarqueurs comme les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF α ont une concentration plasmatique élevée associée à la sévérité du choc septique et à la mortalité des patients (Jawa, 2011 ; Lv *et al.*, 2014). D'autres molécules endothéliales telles que les sélectines-E, les ICAM-1, les VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*) et l'inhibiteur de l'activité du plasminogène 1 (PAI-1) sont également associées au sepsis sévère, à la dysfonction des organes, ainsi qu'à la mortalité (Skibsted *et al.*, 2013). Malgré que les marqueurs sériques soient peu coûteux et sensibles, ils sont dépendants de l'expression des cytokines et ne sont pas spécifiques au sepsis. Le diagnostic de la maladie s'avère difficile étant donné que les signes cliniques et les symptômes d'une inflammation systémique peuvent être confondus avec des conditions critiques non-infectieuses (e.g. traumatisme, brûlure, pancréatite et maladie auto-immune) (Dellinger *et al.*, 2013). Historiquement, le dosage de la PCT, un précurseur de l'hormone calcitonine, était le biomarqueur le plus prometteur puisqu'il avait la propriété de mieux différencier les réponses inflammatoires et les infections bactériennes (Becker *et al.*, 2008). Chez des individus en santé, la PCT n'est seulement sécrétée que par les cellules neuroendocrines de la thyroïde, alors que la molécule est mille fois plus sécrétée par tous les tissus dans les 3 h suivant une infection en réponse à la cascade de cytokines pro-inflammatoires et aux produits bactériens (Preas *et al.*, 2001). Contrairement à la CRP, les niveaux de PCT ne sont pas affectés par l'administration d'une thérapie anti-inflammatoire, tel que le traitement aux corticostéroïdes (Müller *et al.*, 2002). Cependant, différentes études ont révélés des irrégularités de la performance de PCT (Gattas et Cook, 2003; Tang *et al.*, 2007; Tsalik *et al.*, 2012). À ce jour, la PCT n'est utilisée seulement comme un adjuvant et ne peut à elle seule discriminer la présence ou l'absence d'infection chez des patients

développant de la fièvre. Aucun biomarqueur individuel ne reflète adéquatement l'évolution potentielle et rapide du sepsis chez un patient malgré une étroite observation bien que les lipoprotéines de haute densité semblent être un type de biomarqueur précoce de la survie dans le sepsis sévère (Lekkou *et al.*, 2014). Dès lors, les études ont été orientées vers l'utilisation de combinaisons de biomarqueurs pour mieux identifier les patients à risque.

Le seul traitement actuel et appliqué en urgence est le traitement de support ou « *Early goal-directed therapy* » décrit par Rivers *et al.* (Rivers *et al.*, 2001). Il consiste à administrer une antibiothérapie adaptée dans la première heure suivant le diagnostic et un remplissage vasculaire dans les 6 heures suivantes afin de rétablir le débit sanguin. Lorsque la réanimation liquidienne est insuffisante et que le patient présente une hypotension réfractaire, des vasopresseurs sont prescrits le temps nécessaire.

2.2.2 Les corticostéroïdes

Les CS synthétisés (i.e. exogènes) sont des agents immunosuppresseurs fréquemment utilisés dans le traitement de troubles inflammatoires et de maladies auto-immunes. À l'heure actuelle, les CS ont fait leurs preuves, soit parce qu'ils améliorent la survie des patients (méningite bactérienne, péricardite tuberculeuse, pneumocystose modérée à sévère), apportent un bénéfice à long terme (arthrite bactérienne) ou au niveau symptomatique (mononucléose infectieuse, cellulite, pharyngite) (McGee et Hirschmann, 2008; Marwick *et al.*, 2013). Selon le temps, le dosage et la durée du traitement, l'administration des CS est adaptée en fonction des différentes pathologies et peut avoir un impact majeur sur le pronostic des patients. Néanmoins, leur usage reste une thérapie très controversée dans le choc septique en raison de la variation des effets au niveau de la mortalité, de la durée du choc et des effets secondaires indésirables (Rossi *et al.*, 2009).

2.2.2.1 Types de corticostéroïdes naturels

Les CS sont une importante famille d'hormones stéroïdiennes naturellement sécrétées par le cortex de la glande surrénale (Nussey et Whitehead, 2001; Gupta et Bhatia, 2008; Rossi *et al.*, 2009). Leurs actions sont modulées par leur interaction avec les récepteurs à

CS qui régulent la transcription de gènes. On y retrouve trois zones où sont produits différents types de CS. La zone glomérulée, localisée dans le pourtour de la glande surrénale, sécrète les minéralocorticoïdes (MC) dont l'aldostérone qui est le plus puissant. Ils agissent principalement sur la régulation de la rétention active de sodium ainsi que l'élimination du potassium dans les tubules contournés distaux des reins et, par la même occasion, la tension artérielle. Les glucocorticoïdes (GC) produits dans la zone fasciculée, possèdent des propriétés anti-inflammatoires, modulent la réponse immune à divers stimuli chez son hôte et agissent sur le métabolisme lipidique, protéomique et glucidique. Le cortisol (ou hydrocortisone) est le GC principal dans la circulation sanguine. Il agit sur la quasi-totalité des cellules immunitaires (PMN, lymphocytes, monocytes, macrophages, éosinophiles, basophiles) en influençant d'importantes fonctions cellulaires. Plus précisément, il inhibe la migration des PMN et des macrophages vers les sites inflammatoires ainsi que leurs fonctions effectrices. Il freine également la synthèse ou l'action de la plupart des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IFN- γ et TNF α) et des chimiokines et stimulent la production de plusieurs cytokines anti-inflammatoires (IL-1RA, IL-10 et TGF- β). Le cortisol a également un rôle important au niveau de l'homéostasie cardiovasculaire en agissant sur les reins et l'endothélium vasculaire. En effet, il a une action minéralocorticoïde en se fixant sur les récepteurs de l'aldostérone. Au niveau des effets métaboliques, il entraîne une augmentation de la glycémie et inhibe la synthèse lipidique et protéique. Enfin, les androgènes impliqués dans le développement des caractères sexuels, sont sécrétés à la fois dans la zone fasciculée et réticulée qui est la plus proche de la médullaire surrénalienne (Rossi *et al.*, 2009).

La sécrétion des GC, comme le cortisol, est régulée par l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) qui est produite dans le lobe antérieur de l'hypophyse et libérée selon un stress ou un rythme circadien avec une sécrétion pulsatile dont la concentration sanguine est la plus élevée avant le réveil chez l'homme (vers 6 h du matin) (Fig. 3). La sécrétion d'ACTH est elle-même régulée par la production de l'hormone CRH (*Corticotropin-releasing hormone*) sécrétée par l'hypothalamus. Les GC ont une action de rétrocontrôle sur la production d'ACTH et de CRH. De la même façon, lorsque les GC sont en excès (qu'ils soient endogènes ou exogènes), ceux-ci inhibent la production d'ACTH.

Contrairement aux GC, les MC produits ayant des effets seulement à court terme, sont régulés principalement par le système rénine-angiotensine-aldostérone, la concentration sérique de potassium et l'ACTH (Gupta et Bhatia, 2008; Rossi *et al.*, 2009; Gallo-Payet, 2016).

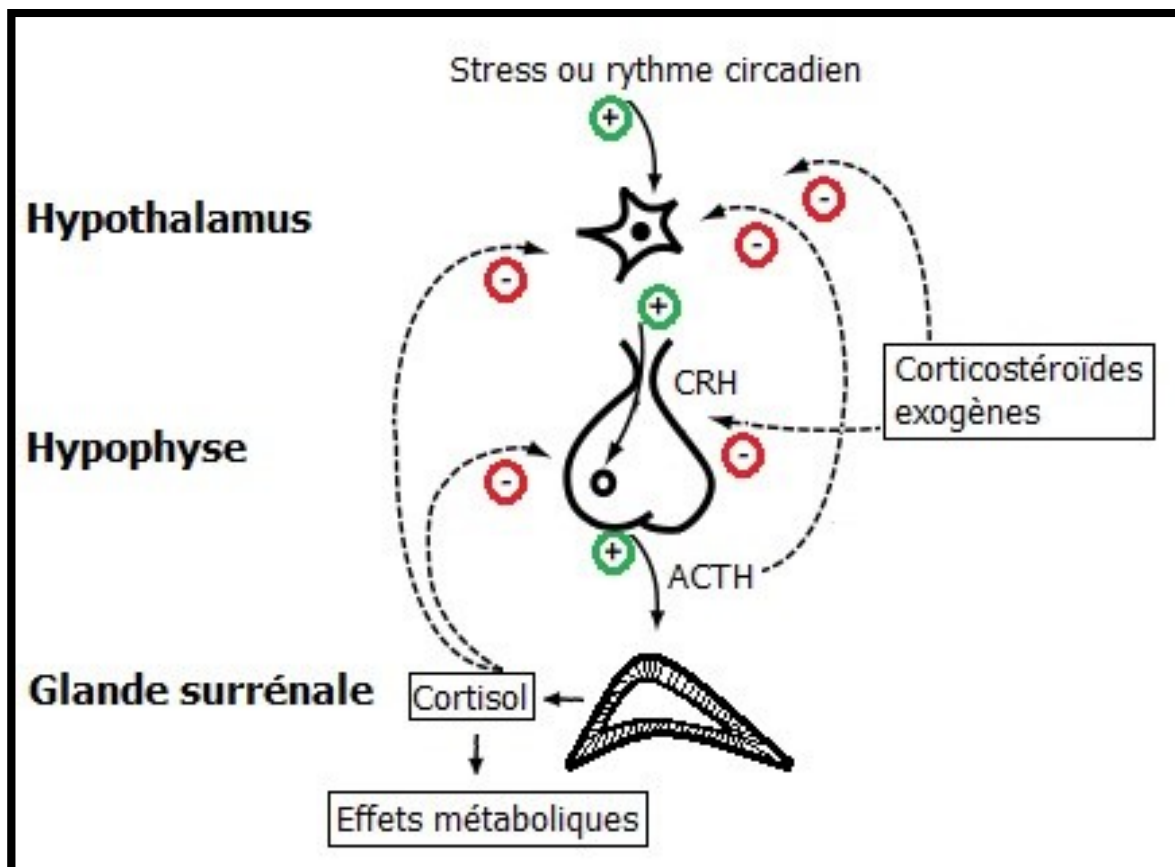


Figure 3 : Régulation de la synthèse de cortisol par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Adaptation libre tirée de : (Rossi *et al.*, 2009). La sécrétion de cortisol dans les glandes surrénales est stimulée par l'ACTH produite par le lobe antérieur de l'hypophyse, elle-même régulée par la sécrétion de CRH provenant de l'hypothalamus due à un stress ou au rythme circadien. Lorsqu'il est en excès, le cortisol (endogène ou exogène) exerce une boucle de rétroaction à la fois sur l'hypophyse et l'hypothalamus. Un excès d'ACTH va également inhiber la sécrétion de CRH. CRH : *Corticotrophin-Releasing Hormone*; ACTH : *Adrenocorticotrophin Hormone*.

2.2.2.1 Traitement par les corticostéroïdes

Les analogues synthétiques des CS sont utilisés essentiellement comme thérapie de substitution pour leurs effets anti-inflammatoires dans plusieurs maladies inflammatoires systémiques non contrôlées (Gupta et Bhatia, 2008). Différents dérivés de CS ont été

synthétisés à partir du cortisol avec une durée d'action plus longue (qui correspond à la durée de l'inhibition de l'axe corticotrope), une activité anti-inflammatoire plus importante avec des propriétés minéralocorticoïdes moindres que la molécule mère. Les plus couramment utilisés à courte action sont l'hydrocortisone, la prednisone et la méthylprednisolone (dans l'ordre croissant de durée d'action) (Tableau 2).

Tableau 2. Équivalence des traitements corticoïdes et demi-vie biologique de l'effet anti-inflammatoire

CS	Activité relative à l'hydrocortisone*		
	Glucocorticoïde	Minéralocorticoïde	Demi-vie biologique (h)
Hydrocortisone	1	1	8-12
Cortisone	0.8	0.8	8-12
Prednisolone	4	0.8	8-12
Prednisone	4	0.8	8-12
Méthylprednisolone	5	0.5	8-12
Dexaméthasone	25	0	36-72
Fludrocortisone	10	125	-

Traduction libre tirée de : (Gupta et Bhatia, 2008). CS : corticostéroïdes.

*Affinité pour le récepteur aux CS

Le traitement actuel par les CS serait recommandé pour des patients en sepsis sévère ou choc septique réfractaire qui répondent insuffisamment à une ressuscitation des fluides et à une thérapie à l'aide de vasopresseurs (dopamine, noradrénaline, adrénaline et vasopressine) (Dellinger *et al.*, 2013). Selon une analyse systématique d'essais randomisés, l'absence d'association significative entre la sévérité initiale du sepsis et l'effet des CS sur la mortalité à 28 jours contredit la restriction de l'utilisation de CS au choc septique réfractaire (Rossi *et al.*, 2009). Il est recommandé d'administrer aux patients 200-300 mg par jour de corticostéroïdes pendant 7 jours ou jusqu'à ce que les vasopresseurs ne soient plus nécessaires (Dellinger *et al.*, 2013). Plusieurs études ont rapporté que l'administration à court terme (1-2 jours) de CS à doses élevées (> 300 mg/ jour) chez des patients atteints d'un choc septique précoce n'avait aucun effet sur le pronostic ou détériorait celui-ci (dû à l'immunosuppression et l'augmentation d'infections secondaires) (Cronin *et al.*, 1995; Zeni *et al.*, 1997). Au contraire, d'autres études menées sur des patients en choc septique (nécessitant des vasopresseurs ou une ventilation mécanique prolongée) ont révélé que

l'administration prolongée (5 jours et plus) de faibles doses d'hydrocortisone (< 300 mg/jour) démontrait des effets bénéfiques. La survie à 28 jours, l'augmentation de la probabilité de résolution du choc et la diminution de la durée du séjour en réanimation ont été observés sans effets secondaires graves malgré des complications métaboliques (Bollaert *et al.*, 1998; Briegel *et al.*, 1999; Annane *et al.*, 2002; Minneci *et al.*, 2004). Toutefois, aucune association entre de faibles doses d'hydrocortisone et la mortalité des patients n'a été observée selon d'autres auteurs (Ferrer *et al.*, 2009; Sprung *et al.*, 2011).

CHAPITRE 3

Les neutrophiles lors du sepsis

Pourquoi alors est-ce que les stratégies thérapeutiques ciblant la cascade cytokinique initiale (agents antagonistes du LPS et cytokines pro-inflammatoires) et le dérèglement de la coagulation (antithrombine et CRP) s'avèrent être tous inefficaces dans le traitement du sepsis ou l'amélioration du pronostic? La complexité de la maladie présente un défi de taille au niveau de notre compréhension sur ce qui est aberrant et les causes à l'origine des altérations cellulaires. Comme il a été abordé dans le premier chapitre, le rôle crucial des PMN réside dans le fait qu'ils sont les premiers témoins lorsque survient une infection. Bien qu'il soit encore mal compris comment le sepsis affecte les PMN, il a été démontré que plusieurs événements clés contribuent au dysfonctionnement du recrutement et des fonctions effectrices des PMN. Dans le présent chapitre, ceux-ci, ainsi que les effets modulateurs des CS seront donc mis en lumière.

3.1 Fonctions neutrophiliques altérées

Plusieurs études ont mis en évidence que les fonctions effectrices des PMN au cours du sepsis sévère sont substantiellement dérégées, ce qui est un événement critique survenant au cours du sepsis. La migration et les réponses antimicrobiennes se voient alors inefficaces au site d'infection et sont directement reliées à la sévérité du sepsis (Muller Kobold *et al.*, 2000; Cohen, 2002; Danikas *et al.*, 2008; Alves-Filho *et al.*, 2010; Kovach et Standiford, 2012).

3.1.1 Libération des neutrophiles

Il a été longuement établi que la libération des PMN de la moelle osseuse en réponse à une infection est initiée par un large éventail de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires, ainsi que de produits bactériens (Christopher et Link, 2007). Toutefois, selon une étude impliquant des modèles murins, il s'avère que le chimioattractant CXCL12 aurait un rôle important dans la libération de PMN au cours du sepsis (Delano *et al.*, 2011). Sous des conditions homéostatiques, l'interaction CXCL12 avec son récepteur (CXCR4) est essentielle dans la rétention de la population de PMN dans la moelle osseuse. Lors

d'une infection, l'équilibre CXCL12/CXCR4 est perturbé dans la moelle osseuse, ce qui déclenche la libération et la mobilisation des PMN dans la circulation sanguine. Dans un contexte septique, l'expression de CXCL12 dans les tissus périphériques est drastiquement augmentée, alors qu'elle diminue dans la moelle osseuse. Ceci suggère qu'il existe un gradient de concentration entre la moelle osseuse et les tissus périphériques favorisant la libération des PMN lors d'une infection. Dans la situation où il n'y a aucune résolution de l'inflammation et un débalancement de l'expression de CXCL12, il se produit alors une accumulation massive de PMN dans les capillaires due à leur libération continue.

3.1.2 Chimiotactisme

L'altération du chimiotactisme des PMN vers le site d'infection a pour conséquence l'échec de l'élimination des pathogènes qui va entraîner une réponse inflammatoire hyperactive causée par l'infiltration inappropriée des PMN dans les organes. L'action microbicide des PMN aura pour effet d'engendrer des dommages tissulaires, et ultimement contribuer au MOF associé au sepsis sévère et au choc septique (Brown *et al.*, 2006). Chez les patients atteints de sepsis, l'altération de la capacité chimiotactique des PMN pourrait être un facteur important dans la détermination d'un pronostic défavorable de la maladie. Le dysfonctionnement migratoire des PMN a été décrit non seulement chez des patients septiques, mais aussi chez différentes pathologies comme le cancer, le diabète et le SIDA, qui sont toutes associées à une susceptibilité élevée aux infections (Frumento *et al.*, 1984; Mastroianni *et al.*, 1999; Alba-Loureiro *et al.*, 2007). Il est connu que la réponse chimiotactique au fMLF et au LTB₄ est supprimée dans les PMN provenant de patients septiques lorsqu'ils sont comparés à des sujets sains (Tavares-Murta *et al.*, 2002; Demaret *et al.*, 2015). Toutefois, d'autres études ont observé que les PMN de patients septiques avaient des réponses chimiotactiques normales à la suite d'une stimulation au fMLF (Cummings *et al.*, 1999). Cette différence pourrait résider dans le fait que le pronostic des patients n'a pas été comparé entre les études, car selon Tavares *et al.*, le chimiotactisme des PMN provenant de patients non survivants est significativement plus altéré que chez les survivants atteints de sepsis (Tavares-Murta *et al.*, 2002; Demaret *et al.*, 2015). Chishti *et al.*, tout comme Reddy *et al.* ont également observé une réponse chimiotactique altérée en réponse à l'IL-8 (Chishti *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2008).

Les mécanismes impliqués dans le chimiotactisme des PMN au cours du sepsis sont altérés à plusieurs niveaux. La migration des PMN peut être modulée par les produits bactériens, les cytokines et les chimiokines via l'induction d'une réorganisation du cytosquelette et l'inhibition des interactions entre les PMN et les cellules endothéliales. Comme mentionné précédemment, l'expression ou la signalisation des GPCR ont un effet direct sur la désensibilisation des récepteurs à chimiokines. Il a été démontré que le dysfonctionnement migratoire est une conséquence de la diminution de CXCR2 dans les PMN en circulation (Alves-Filho *et al.*, 2009; Rostan *et al.*, 2015). L'activation systémique des récepteurs TLR peut également contribuer à l'altération de la migration des PMN. Au cours du sepsis, la production de composés bactériens, tel que le LPS, peut déclencher l'augmentation de l'expression de GRK2, lequel supprime l'expression de CXCR2 qui favorise la migration des PMN au site d'infection et l'élimination de celle-ci (Alves-Filho *et al.*, 2006; Alves-Filho *et al.*, 2009). En effet, l'atténuation de la voie de signalisation TLR peut être bénéfique dans le traitement du sepsis, puisqu'une augmentation du niveau de survie a été observée chez des modèles murins déficients en TLR ou dont les récepteurs ont été bloqués (Alves-Filho *et al.*, 2009). L'IL-33 a un effet protecteur en maintenant le niveau d'expression de CXCR2 par la prévention de l'induction de GRK2. Ceci aurait pour effet de prévenir la séquestration de PMN dans les capillaires, surtout au niveau pulmonaire. Toutefois, les modèles expérimentaux de sepsis murins atteints sévèrement produisent une plus grande quantité de sST2 qui neutralise l'axe IL-33/ST2. Les mêmes caractéristiques ont été décrites chez l'humain : le sepsis provoque une concentration plasmatique élevée en sST2 et diminue le chimiotactisme des PMN qui expriment peu de CXCR2 (Alves-Filho *et al.*, 2010; Rostan *et al.*, 2015). Ces aspects sont d'autant plus amplifiés chez les patients non survivants selon une étude qui suggère que sST2 est associé non seulement à la sévérité du sepsis, mais également à un mauvais pronostic des patients (Hoogerwerf *et al.*, 2010). Cependant, on ignore encore quelles sont les sources principales d'IL-33 et de sST2 chez les patients septiques et comment évolue l'expression d'IL-33, ST2 et sST2 dans le temps. Toutefois, il a été observé que les cellules mononucléaires du sang périphérique infectées *in vitro* par des leptospires ne sécrétaient pas de sST2, ce qui

suggère que la libération de sST2 pourrait survenir suite aux dommages tissulaires chez des patients atteints sévèrement de leptospirose (Wagenaar *et al.*, 2009).

Les mécanismes impliqués dans l'infiltration et l'accumulation de PMN dans les organes au cours du sepsis ne sont pas entièrement connus. Parmi eux, on retrouve le récepteur à chimiokines CCR2 qui est exprimé principalement par les monocytes, alors qu'il ne l'est pas chez des PMN au repos. Cependant, une inflammation chronique a pour effet d'induire l'expression de ce récepteur à la surface de PMN circulatoires (Johnston *et al.*, 1999). Exprimé après le déclenchement du sepsis, il a un rôle majeur menant à une infiltration et une séquestration inappropriées des PMN aux organes éloignés du site d'infection chez des modèles murins atteints de sepsis (Souto *et al.*, 2011). Cette accumulation de PMN va alors entraîner des dommages tissulaires et ainsi contribuer au MOF associé au sepsis sévère et au choc septique. Chez des patients septiques, il a été décrit que les PMN expriment fortement le CCR2 et que l'augmentation du chimiotactisme aux ligands CCR2 est associée à la sévérité de la maladie (Kapoor et Thiernemann, 2011; Souto *et al.*, 2011).

D'autres types de mécanismes peuvent aussi être impliqués dans le dysfonctionnement migratoire des PMN tels que l'exposition aux températures élevées, l'activation du facteur de transcription nucléaire anti-inflammatoire PPAR- γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor- γ*), et l'inhibition des interactions entre les PMN et l'endothélium via les sélectines-P due au NO et ses métabolites (Santos *et al.*, 2012). De plus, le NO induit l'expression de HO-1, lequel peut inhiber le roulement des PMN et leur adhésion (Freitas *et al.*, 2006). Les MP circulatoires libérées au cours du sepsis peuvent également influencer l'adhérence des PMN et leur transmigration (Reddy et Standiford, 2010).

3.1.3 Adhésion

Le déséquilibre d'une adhésion adéquate des PMN au cours du sepsis a pour conséquence de perturber leur transmigration vers le site d'infection et de provoquer une agglomération dans la microcirculation (Kovach et Standiford, 2012; Schmidt *et al.*, 2012).

3.1.3.1 Altérations dans la rigidité et la séquestration des PMN

Les endotoxines bactériennes tout comme les cytokines pro-inflammatoires libérées par l'hôte en réponse à une infection, ont pour conséquence d'augmenter la rigidité de la membrane cellulaire des PMN (Kovach et Standiford, 2012). Ceci occasionne une diminution de la capacité des cellules à se déformer, dans le but de préserver leurs fonctions, par exemple lors d'une forte période de fièvre. Ce changement de rigidité augmente proportionnellement avec la sévérité de la maladie chez des patients septiques. Les PMN migrant massivement au site d'infection se retrouvent alors séquestrés dans les capillaires, principalement au niveau pulmonaire et hépatique. Des complications telles que l'ischémie du tissu et le MOF peuvent survenir suite à la formation d'occlusions microvasculaires (Skoutelis *et al.*, 2000). Il a été observé chez des modèles murins que les PMN stimulés *in vitro* par fMLF ou TNF α sont associés à une accumulation d'actine filamenteuse à la surface membranaire (Saito *et al.*, 2002).

3.1.3.2 Altérations dans l'expression de récepteurs membranaires des PMN

L'expression de CD66b est associée à l'activation, l'adhésion et à la migration des PMN. Dans un contexte de sepsis, le phénotype des PMN non stimulés en circulation est considérablement modifié. Le niveau d'expression de CD66b observé chez les patients septiques est cependant très variable d'une étude à l'autre. Certains ont démontré que l'augmentation de l'expression de CD66b est associée au pronostic des patients lorsque l'on compare ceux-ci avec des témoins (Muller Kobold *et al.*, 2000; Chishti *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2014). Le groupe de Silva *et al.* qui avait constaté une augmentation de l'expression de CD66b, n'ont noté aucune différence entre les deux groupes dans l'une de leur précédente étude (Martins *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014). La diminution de l'expression de ce récepteur a été également observée (Nakae *et al.*, 1996). Les différences entre les résultats de ces études pourraient être reliées à l'hétérogénéité des groupes de patients septiques, surtout si la sévérité de la maladie est un facteur majeur de l'expression de CD66b. Outre les altérations de la déformabilité des PMN, l'augmentation de l'adhésion via CD66b va habituellement entraîner une agrégation massive de ceux-ci dans les capillaires (Schmidt *et al.*, 2012).

3.1.4 Dégranulation

Des taux sanguins trop élevés ou trop bas de PTX3 synthétisés par les PMN chez les patients septiques sont associés à un mauvais pronostic (Mauri *et al.*, 2010; Bastrup-Birk *et al.*, 2013; Uusitalo-Seppälä *et al.*, 2013). Les propriétés opsonisantes de la PTX3 deviennent alors délétères pour la migration des PMN, puisque qu'une surproduction de PTX3 peut entrer en compétition avec les sélectines-P endothéliales et ainsi inhiber la migration des PMN (Deban *et al.*, 2010).

D'autres facteurs peuvent être également responsables des altérations migratoires des PMN comme le trio HHH (Hème/HPx /HO-1) (Freitas *et al.*, 2006; Spiller *et al.*, 2011). Des taux sanguins bas d'HPx sont souvent associés à une augmentation de la mortalité lors d'un sepsis expérimental dû à l'augmentation des taux sanguins d'hème hautement oxydatifs. Ce dernier peut être grandement amélioré par l'ajout exogène d'HPx (Larsen *et al.*, 2010; Janz *et al.*, 2013). De plus, HPx peut réduire in vitro la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les monocytes (Liang *et al.*, 2009). Toutefois, Spiller *et al.* ont démontré que l'HPx a directement un effet inhibiteur sur la migration des PMN dans un modèle murin de sepsis, malgré ses propriétés anti-oxydatives (Spiller *et al.*, 2011). Il réduirait la réponse chimiotactique des PMN induite par C5a ou MIP-2 (*Macrophage inflammatory protein-2*), diminuerait CXCR2, ainsi que les sélectines-L, et augmenterait l'expression de CD11b à la surface des PMN. Chez les patients septiques, l'expression et/ou l'activité d'HO-1 est augmentée de façon variable avec des impacts différents sur le stress oxydatif, mais dont la suppression induit une létalité élevée (Larsen *et al.*, 2010; Takaki *et al.*, 2010; Spiller *et al.*, 2011). La sur-activation de cette enzyme anti-oxydante peut également entraîner une dysfonction migratoire et une apoptose altérées chez les PMN dans le sepsis (Freitas *et al.*, 2006).

3.1.5 Phagocytose

La plupart des études cliniques indiquent que le sepsis influence de façon considérable l'activité phagocytaire des PMN (Arraes *et al.*, 2006; Kovach et Standiford, 2012). Toutefois, le comportement de celle-ci au cours du sepsis reste controversé. Certains médiateurs bactériens comme des facteurs dérivés de l'hôte (e.g. IL-10 et les ligands

PPAR- γ) peuvent dans les deux cas entraîner un dysfonctionnement de la phagocytose (Fernandez Falcon *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2012). En effet, le patron d'expression de CD64 sur les PMN chez les patients en choc septique est grandement variable selon sa densité et les cytokines qui le régulent. Bien qu'il soit établi que l'augmentation de l'expression de CD64 favorise la phagocytose chez les PMN sains, cette association n'est cependant pas clairement démontrée chez les patients septiques (Danikas *et al.*, 2008). Hirsh *et al.* ont démontré au contraire qu'une diminution de l'activité phagocytaire a été associée à une surexpression de CD64 chez les PMN (Hirsh *et al.*, 2001). Dans la situation où l'expression de CD64 serait élevée dans les premiers jours suivants le choc initial, ceci pourrait être expliqué par l'activation persistante des PMN. Lors de la résolution de l'infection (après 3 jours), le niveau d'expression de CD64 diminue probablement en raison de la libération de cytokines anti-inflammatoires comme IL-4 et IL-13. Advenant le cas d'une baisse, celle-ci indiquerait un niveau trop faible de l'expression de CD64 et de l'activité des fonctions neutrophiliques lors de l'infection et du choc septique. Selon Danikas *et al.*, les altérations de l'activité phagocytaire des PMN et de l'expression de CD64 ont été fortement associées avec un mauvais pronostic chez des patients septiques (Danikas *et al.*, 2008). Ils ont également suggéré que la diminution de la phagocytose des PMN chez des patients atteints de SDRA pourrait être due à l'épuisement des cellules qui sont continuellement stimulées par des cytokines ou à une altération de la voie de signalisation initiée par CD64. Livaditi *et al.* ont également suggéré qu'une augmentation de l'expression de CD64 des PMN associée à une altération de la phagocytose pourrait être reliée à un mauvais pronostic chez les patients septiques (Livaditi *et al.*, 2006). Alors que chez les patients non septiques l'augmentation de l'expression de CD64 a pour conséquence d'augmenter la phagocytose, celle-ci a pour effet chez des patients septiques d'induire l'adhérence des PMN à l'endothélium vasculaire (Fadlon *et al.*, 1998).

L'activation des récepteurs TLR (TLR2, TLR4) est également persistante au cours de la phase précoce du sepsis (Weighardt et Holzmann, 2007). Le maintien des voies de signalisation des TLR via l'activation de NF- κ B et des MAP kinases a été associé à l'expression excessive de cytokines inflammatoires et aux dommages tissulaires chez les

patients septiques (O'Neill, 2006; Weighardt et Holzmann, 2007; Khakpour, *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

3.1.6 Production de radicaux libres oxygénés

Malgré qu'ils représentent une arme de défense contre les pathogènes invasifs, les ROS peuvent également être la cause de dommages tissulaires importants chez l'hôte. Comme le recrutement des PMN peut être retardé ou défaillant au cours du sepsis, la production excessive de ROS agresse les tissus et autres molécules, entraînant alors un échec de réparation tissulaire et le maintien d'une condition septique non résolue. Plusieurs rapports émis sur la production de ROS dans un contexte septique sont cependant contradictoires (MacDonald *et al.*, 2003). Certaines études ont appuyé une augmentation de la génération de ROS au cours du sepsis associée à la gravité de la maladie (Macdonald et al., 2003; Kaufmann, Hoelzl, Schliephake, Hummel, Chouker, Peter, & Thiel, 2006; Santos et al., 2012). Toutefois, selon d'autres études, une diminution de la production de ROS a été observée chez les PMN de patients atteints de sepsis et serait plus importante dans les 4 premières journées de la maladie (Wenisch *et al.*, 1999; Demaret *et al.*, 2015). De surcroît, le même phénomène a été observé *in vitro* lors d'un transfert de plasma septique à des PMN de personnes en santé. À l'inverse, l'ajout de plasma provenant de témoins à des PMN de patients septiques entraînait une augmentation transitoire de la production de ROS (Wenisch et Graninger, 1995). Ces résultats démontrent qu'il y a une altération dynamique chez les patients septiques et que la flambée oxydative peut être influencée par plusieurs facteurs plasmatiques.

Plusieurs médiateurs humoraux mobilisés dans la phase précoce du sepsis comme l'endotoxine, le TNF α , l'IL-1, l'IL-8, l'IFN- γ , les composés activés du complément, le G-CSF et le PAF, sont connus pour activer les PMN et augmenter la production de ROS. Toutefois, l'endotoxine elle-même peut avoir un effet inhibiteur sur la flambée oxydative (Wilson, 1985).

3.1.7 Apoptose

La perturbation de l'homéostasie de l'apoptose chez les PMN, que cette fonction soit retardée ou accélérée, peut engendrer de sévères conséquences pathologiques. Comme il a été décrit précédemment, les PMN ont des propriétés hautement microbicides et sont les premières cellules à migrer au site d'infection pour contenir celle-ci. Au cours du sepsis, la production de cytokines pro-inflammatoires peut avoir comme effet de retarder l'apoptose chez les PMN et macrophages activés, prolongeant ou augmentant indûment ainsi la réponse pro-inflammatoire. Ces derniers peuvent potentiellement causer des dommages importants aux cellules saines avoisinantes via la libération continue de leurs granules dans la circulation et contribuer au développement du dysfonctionnement des organes (Lesur *et al.*, 2000; Maugeri *et al.*, 2006). Plusieurs études ont observé une relation inversement proportionnelle entre l'apoptose et la sévérité du sepsis chez les patients et reconnaissent celui-ci comme étant un facteur important dans la pathophysiologie de la maladie (Fialkow *et al.*, 2006; Milot *et al.*, 2012; Luan *et al.*, 2015). De plus, le sepsis induit l'effet contraire chez les lymphocytes et les cellules dendritiques : l'apoptose est augmentée et diminue l'efficacité de la réponse immunitaire, et par conséquent, l'élimination des pathogènes. L'apoptose excessive des lymphocytes augmente avec la sévérité du sepsis. Il a été observé qu'il y a également une présence d'apoptose chez les cellules parenchymateuses, endothéliales et épithéliales (Luan *et al.*, 2015).

Le sepsis est caractérisé par une cascade d'événements prolongeant la mort programmée des PMN qui est délétère pour plusieurs types de tissus. Il a été démontré par Mica *et al.* que chez des patients septiques, l'apoptose retardée des PMN implique l'activation du facteur nucléaire NF- κ B et la suppression des caspases-9 et -3 (Mica *et al.*, 2004). Des niveaux intracellulaires élevés de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (*Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1*) ont été observés chez des PMN de patients atteints de sepsis sévère. Ce sont les kinases cycline-dépendantes, membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, qui ont un rôle clé dans la régulation de Mcl-1. D'autres voies de signalisation sont touchées et mènent au retard de l'apoptose au cours du sepsis selon les résultats de Mica *et al.*, qui suggèrent qu'une activation bactérienne de TLR2 et CD14 à la surface des PMN diminuerait le potentiel transmembranaire des mitochondries.

Ceci entraînerait alors la dégradation de la caspase-3 active, et par conséquent, le retard de l'apoptose (Mica *et al.*, 2004). Selon d'autres études, il a été démontré au contraire qu'une phosphorylation prolongée de p-38 MAPK serait associée à une diminution de Mcl-1, laquelle accélérerait l'apoptose (Derouet *et al.*, 2006).

3.2 Production de médiateurs de l'inflammation altérée

Lors d'une infection ou d'une blessure, la réponse normale chez l'hôte consiste à libérer des médiateurs pro-inflammatoires afin d'éliminer les pathogènes. Une fois que l'inflammation est résolue, des médiateurs anti-inflammatoires vont être libérés à leur tour afin de diminuer la réponse de leurs prédécesseurs. Toutefois, cette balance des réponses pro- et anti-inflammatoires est fréquemment perdue lors d'un sepsis comme les mécanismes de défenses de l'hôte s'avèrent insuffisants pour éliminer les pathogènes. La réponse massive pro-inflammatoire devient alors systémique et fréquemment suivie d'une réponse anti-inflammatoire compensatrice démesurée (Bone, 1996a; Muller Kobold *et al.*, 2000). Un vaste éventail de biomarqueurs pro- (IL-1 α et IL-1 β , TNF α et IL-6), anti-inflammatoires (IL-1RA et IL-10) et de médiateurs lipidiques (RV et LX) est associé à la mortalité des patients septiques (Iskander *et al.*, 2013).

Il a été longtemps décrit chez les patients septiques qu'un stimulus bactérien était à l'origine de la première phase du sepsis, soit le SIRS (Calandra *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1997; Riché *et al.*, 2000). Cet état est caractérisé par une réaction inflammatoire excessive initiée par la libération systémique de cytokines (particulièrement IL-1, TNF α , IL-6 et IFN- γ). Au fil des recherches, il est apparu que le sepsis présente deux types de portraits inflammatoires, puisque que le concept d'un état SIRS ne s'appliquait pas systématiquement à l'évolution du sepsis. On pouvait s'en apercevoir surtout dans la phase tardive du sepsis qui est fréquemment décrite par un faible système immunitaire. Afin de classer ces deux situations, Bone *et al.* ont décrit le sepsis en deux phases distinctes : la phase aigüe SIRS et la phase chronique CARS (*Compensatory anti-inflammatory response syndrome*) (Bone, 1996b). Le SIRS décrit la libération systémiques de cytokines mentionnée précédemment, alors que le CARS décrit un état immunosupprimé, que l'on nomme l'immuno-paralysie, associé à un dysfonctionnement des lymphocytes et des

phagocytes, ainsi qu'à la production augmentée de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-1RA et les récepteurs solubles du TNF α) et diminuée de cytokines pro-inflammatoires (Bone, 1996c; Franks *et al.*, 2015; Arens *et al.*, 2016). De plus, afin de décrire le balancement transitoire qui se produit entre l'alternance des phases SIRS et CARS, on a nommé ce phénomène : MARS (*Mixed antagonist response syndrome*) (Ostanin *et al.*, 2000; Cavaillon *et al.*, 2001; Oberholzer *et al.*, 2001). Toutefois, cette classification SIRS/CARS par laquelle on pouvait définir le status inflammatoire d'un patient (hyper- ou hypo-inflammatoire) à partir d'une sélection de cytokines circulatoires et de médiateurs lipidiques, s'avère incorrecte et simultanée. En effet, il a été démontré qu'un patient septique ayant des concentrations élevées d'IL-6 et de TNF α , avait aussi des niveaux élevés de cytokines anti-inflammatoires d'IL-10 et d'IL-1RA retrouvés normalement dans la phase CARS. Dans cette situation, le status du patient ne peut être hyper-inflammatoire, mais plutôt apparenté à la définition du MARS (Osuchowski *et al.*, 2006). Il a été suggéré que la concentration de médiateurs anti-inflammatoires tend à être prédominante à mesure que le sepsis évolue, et ce, malgré la présence légèrement moins prononcée de cytokines pro-inflammatoires (Hotchkiss *et al.*, 2009; de Pablo *et al.*, 2011). Il est cependant difficile de démontrer ce concept, particulièrement chez les patients septiques, étant donné la complexité et l'hétérogénéité marquée du sepsis. La progression temporelle, l'origine de la maladie et la comorbidité des patients ainsi que le manque de mesures de références précoces sont tous des facteurs qui empêchent de catégoriser ceux-ci selon leur profil cytokinique (Gogos *et al.*, 2010).

3.3 Impact des corticostéroïdes sur les fonctions neutrophiliques

Les CS ont un rôle modulateur important à plusieurs niveaux de l'immunité innée. Toutefois, les mécanismes moléculaires d'action des CS sont complexes et encore mal connus (Rossi *et al.*, 2009). Les CS agissent par le biais d'un récepteur cytosolique spécifique sous forme inactive puisqu'il est lié à un complexe protéique. Ils ont la capacité de traverser la membrane cytoplasmique par diffusion passive et leur interaction avec le récepteur à CS va permettre la dissociation du complexe protéique et la translocation nucléaire de l'ensemble ligand-récepteur afin de moduler la régulation transcriptionnelle. On distingue des effets génomiques et non génomiques. Ces derniers sont précoces dans

l'ordre de minutes suivant l'administration de CS et peuvent découler de l'interaction avec des sites membranaires ou liés à la libération de protéines chaperonnes lors de la liaison des CS avec leur récepteur. Les effets génomiques peuvent survenir après quelques heures suivant l'administration de CS. Le complexe CS/récepteurs aux CS peut agir directement comme un facteur de transcription en se liant à des gènes cibles ou indirectement en interagissant avec les facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et NF-IL6. Cette action indirecte constitue le principal mécanisme responsable des effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs des CS. Ainsi, les fonctions des PMN comme d'autres cellules immunitaires sont modulées par l'action des CS (Rossi *et al.*, 2009).

Les effets des CS sont dépendants du contexte cellulaire : rôle inhibiteur dans les cellules hématopoïétiques (PMN, éosinophiles, basophiles, mastocytes, macrophages et cellules dendritiques) et activateur dans les cellules non hématopoïétiques (fibroblastes et cellules endothéliales) (Belvisi, 2004). Chez les PMN, les CS ont pour effet d'atténuer la production et la libération et/ou l'efficacité de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et IL-8, probablement dû à l'inhibition de la signalisation du NF- κ B (Briegel *et al.*, 1999; Keh *et al.*, 2003; Oppert *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 2006; de Kruif *et al.*, 2007). La surexpression de CD64 neutrophilique, que Dimoula *et al.* proposent comme un marqueur potentiel du sepsis, persiste et demeure discriminant dans le sous-groupe de patients septiques traités aux CS (Dimoula *et al.*, 2014). Ils diminuent aussi la sélectine-E soluble qui est exprimée lors d'une activation endothéliale, alors qu'ils n'ont pas d'effet sur l'expression élevée de CD66b chez les PMN de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Torsteinsdóttir *et al.*, 1999; Keh *et al.*, 2003). Indirectement, cela aura comme conséquence d'affecter les fonctions des PMN comme le chimiotactisme et la production de ROS. En effet, les CS ont un effet inhibiteur sur le chimiotactisme des PMN tout comme ils peuvent n'avoir aucun effet ou diminuer *in vitro* la production spontanée de ROS (Levine *et al.*, 1981; Békési *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2008). Des doses élevées de CS (méthylprednisolone) causant l'inhibition de l'agrégation de PMN en réponse au fMLF, peut diminuer l'interaction des récepteurs au fMLF à leur ligand et causer la désensibilisation des PMN de façon réversible (Skubitz et Hammerschmidt, 1986).

Chez l'humain, les CS peuvent agir directement sur la prolifération des cellules progénitrices des PMN *in vitro*, et favoriser la production et la libération des PMN dans la circulation sanguine (Bjornson *et al.*, 1985; Crockard *et al.*, 1998). Selon une étude menée par Crockard *et al.*, la leucocytose sanguine observée chez les patients atteints de sclérose en plaques suite au traitement par les CS est associée à une diminution de l'expression de la sélectine-L et de Mac-1 (Crockard *et al.*, 1998). Ceci pourrait diminuer par conséquence l'adhésion des PMN marginés et leur capacité à migrer hors de la circulation sanguine (Crockard *et al.*, 1998; Boss *et al.*, 1999). L'étude menée par Naqagawa *et al.* a également décrit que l'administration de CS induisait une leucocytose en favorisant la libération des PMN et prolongeant leur survie dans la circulation sanguine. Cependant, l'augmentation des PMN dans les vaisseaux sanguins serait due principalement à la démargination de ceux-ci par les CS (Nakagawa *et al.*, 1998).

Les CS n'agissent pas seulement comme de simples inhibiteurs de l'inflammation et de l'immunité, mais augmentent également les composés du complément et favorise la dégranulation en augmentation *in vivo* la production de PTX3 dans la circulation sanguine (Doni *et al.*, 2008). Les protéines de la matrice extracellulaire vont être sélectivement augmentées en présence de CS. De surcroît, la phagocytose des PMN est maintenue par ce traitement, malgré que la cascade pro-inflammatoire soit atténuée (Kaufmann *et al.*, 2008). En contraste avec les lymphocytes T, les CS peuvent prolonger la durée de vie des PMN *in vitro* en retardant l'apoptose (Liles *et al.*, 1995; Heasman *et al.*, 2003; Belvisi, 2004; Marwick *et al.*, 2013).

ARTICLE 1

Paralysed neutrophil functions and corticosteroids in severe sepsis and refractory septic shock patients

Auteurs de l'article: Julie Lamoureux*, Aurélie Le Page, Karine Bourgade, Tamàs Fülöp et Olivier Lesur

Statut de l'article: Soumis le 22 janvier 2016, actuellement en révision

Titre du journal : *Shock*

Avant-propos: Cet article présente l'auteur principal, indiqué par un astérisque, ainsi que les co-auteurs. J'ai participé au recrutement des patients et contribué au plan de recherche, aux protocoles de mesure, aux prises de mesure, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. Aurélie Le Page et Karine Bourgade ont collaboré à la réalisation des protocoles de mesure. Aurélie Le Page, Tamàs Fülöp et Olivier Lesur ont participé à la révision du manuscrit. Tamàs Fülöp et Olivier Lesur ont conçu le plan de recherche de cette étude, supervisé le projet, participé à l'analyse des résultats et révisé la version finale du manuscrit. Olivier Lesur a recruté les patients et Tamàs Fülöp a recruté les contrôles.

Résumé : Les neutrophiles (PMN) sentinelles sont essentiels dans le contrôle du sepsis et dans la mise en place du système immunitaire inné. L'efficacité et la fonctionnalité des PMN, tout comme les effets de faibles doses de corticostéroïdes (CS) sur ceux-ci, n'ont pas été complètement explorés dans le choc septique à ce jour. La présente étude s'est intéressée aux fonctions majeures et au profil phénotypique des PMN sanguins provenant de patients atteints de sepsis sévère ou de choc septique (G1) et de choc septique réfractaire (G2) (N=32) au cours des 3 premiers jours suivant leur admission. Les impacts de faibles doses de CS sur les paramètres cliniques et les fonctions des PMN ont été analysés *in vitro* et *in vivo*. L'augmentation de l'adhésion des PMN induite par le sepsis, contrairement à la migration, a été amplifiée par le traitement aux CS *in vivo* (G2 vs. contrôles sains, $p < 0.05$),

alors que les CS *in vitro* réduisent le chimiotactisme des PMN ($p < 0.05$ vs. G1). L'activité phagocytaire induite par le sepsis était atténuée ($p < 0.05$ vs. contrôles sains), et la flambée oxydative inchangée, sans influence évidente des CS. Le haut contenu de PTX3 des PMN de patients septiques n'a pas été clairement modifié par les CS. L'élévation associée au sepsis de l'expression de CD64 des PMN chez les patients septiques (+65 à +111%) était diminuée par les CS *in vivo*, alors que l'augmentation de ST2 correspondante était davantage augmentée par ce traitement à J3 (G2 vs. contrôles sains, $p < 0.05$). **En conclusion**, le sepsis induit un débalancement/paralysie immun soutenue des fonctions des PMN chez les patients et qui augmente avec la sévérité de la maladie. Des doses physiologiques de CS *in vitro* n'améliorent pas clairement dans son ensemble les fonctions des PMN et leur profil phénotypique chez les patients atteints de sepsis sévère et choc septique réfractaire, ni même dans les 3 jours suivant leur admission.

PARALYZED NEUTROPHIL FUNCTIONS AND CORTICOSTEROIDS IN SEVERE SEPSIS AND REFRACTORY SEPTIC SHOCK PATIENTS

Julie Lamoureux¹; Aurélie Le Page², Karine Bourgade² Tamàs Fülöp²; and Olivier Lesur^{1,3*}

¹Centre de Recherche Clinique du CHUS, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

²Centre de Recherche sur le Vieillissement, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

³Unité des Soins Intensifs Médicaux, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

Summary Sentence: Immune paralysis of PMN functions associated to acute sepsis in patients is persisting over time; severity-associated; and not clearly influenced by corticosteroids.

Running title: Corticosteroids and paralyzed PMN functions in septic shock patients.

Julie Lamoureux : Julie.Lamoureux@USherbrooke.ca ; Aurélie Le Page : Aurelie.Le.Page@USherbrooke.ca , Karine Bourgade : Karine.Bourgade@USherbrooke.ca; Tamàs Fülöp : Tamas.Fulop@USherbrooke.ca

***Preliminary data of this work were presented at the « International Symposium: Neutrophils 2014 » July 2014, Montreal, Quebec, Canada.**

***Corresponding author information:** Olivier Lesur MD, PhD, Department of Intensive Care Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001 12th Avenue Nord, Sherbrooke, J1H 5N4, Québec, Canada. Phone: 819 346-1110 ext. 14817. E-mail: Olivier.Lesur@USherbrooke.ca

Keywords: Adhesion, apoptosis, chemotaxis, flow cytometry, oxidative burst, phagocytosis

Total character count: 25557

Total number of figures & tables: 10

Total number of colour figures: 0

Total number of references: 42

Total number of words in the Abstract: 245

Total number of words in the summary sentence: 22

Abbreviations Page

APACHE II; Acute physiology and chronic health evaluation II, C5a; Complement component 5a, CD; Cluster of differentiation, CHUS; Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke, COPD; Chronic obstructive pulmonary disease, CS; Corticosteroids, D1-3; Day 1-3, DHR; Dihydrorhodamine, ERK1-2; Extracellular signal-regulated kinase 1-2, FBS; Fetal bovine serum, Fc; Fragment crystallisable, FITC; Fluorescein isothiocyanate, fMLF; Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, G1-2; Group 1-2, GM-CSF; Granulocyte macrophage colony stimulating factor, GRK2; G protein-coupled receptor kinase 2, G1+CS; CS-treated cells of group 1, HPx; Hemopexin, HO-1; Heme oxygenase-1, ICU; Intensive care unit, IgG; Immunoglobulin G, IL; Interleukine, IL-1RA; Interleukine-1 receptor antagonist, IL-1RAP; Interleukine-1 receptors accessory protein, LPR; Low-density lipoprotein receptor-related protein, LPS; Lipopolysaccharide, MFI; Mean fluorescence intensity, MNDA; Myeloid cell nuclear differentiation antigen, PerCP; Peridinin chlorophyll protein, PA; Phagocytic activity, PAMP; Pathogen Associated Molecular Pattern, PBS; Phosphate-buffered saline, PI[†]; Propidium iodide, PI; Phagocytic index, PMA; Phorbol myristate acetate, PMN; Neutrophils, PTX3; Pentraxin 3, ROS; Reactive oxygen species, RPMI; Roswell Park Memorial Institute, SIRS; Systemic inflammatory response syndrome, ST2; Interleukine-33 receptor, sST2; Soluble isoform ST2, TLR; Toll-like-receptor, TNF; Tumor necrosis factor

Abstract

Alarmed neutrophils (PMN) are essential in the control of sepsis as part of the innate immune system. Efficiency and functionalities of PMN as well as the effects of low-dose of corticosteroids (CS) on those, have not been fully explored in septic shock to date. The present study investigated major functions and phenotype profile of peripheral blood PMN from severe sepsis or septic shock (G1) and refractory septic shock (G2) patients (n=32) during the first 3 days following admission. The impacts of low-doses of CS on clinical parameters and PMN functions were assessed *in vitro* and *in vivo*. Increased sepsis-induced PMN adhesiveness but not migration was further enhanced by CS *in vivo* (G2 vs. healthy volunteers, $p<0.05$), whereas CS *in vitro* reduced PMN chemotaxis ($p<0.05$ vs. G1). Sepsis-related phagocytosis activity was blunted ($p<0.05$ vs. healthy volunteers), and oxidative burst unchanged, without obvious influence of CS. High PTX3 content was not clearly modified by CS in PMN from septic patients. Sepsis-associated elevation of CD64 PMN expression in septic patients (+65-to-+111%) was reduced by CS *in vivo*, whereas the corresponding rise of ST2 was further enhanced by this treatment at D3 (G2 vs. healthy volunteers, $p<0.05$). *In conclusion*, sepsis induces a sustained immune imbalance/paralysis of PMN functions in patients, increasing with sepsis severity. Physiological doses of CS *in vitro* and *in vivo* do not clearly improve overall blood PMN functions and phenotype profile in severe sepsis and refractory septic shock patients, not even three days following the admission.

INTRODUCTION

Severe sepsis and refractory septic shock with multiple organ failure are heterogeneous and inflammatory syndromes in response to an overwhelming infection. With mortality rates of 30-to-70% despite improved supportive care, they are major issues in ICU wards [1,2]. Further knowledge in phenotypic characterization and validation of new biomarkers and scores is mandatory to allow earlier recognition of severe sepsis and initiation of personalized treatments.

Massive recruitment of polymorphonuclear granulocytes (PMN) to the aggressed site and recognition/ elimination of pathogens by phagocytosis (PA), oxidative burst and degranulation, is a very first step of the innate immunity [3]. Once the infection neutralized, PMN enter into a constitutive programmed cell death (apoptosis) to minimize tissue damage [4]. However, all these orchestrated PMN functions can become deregulated during chronic or acute inflammatory diseases [5-9]. Negative outcome issues can then result from impaired migration to the infectious foci, inadequate antimicrobial and oxidative burst responses, or delayed apoptosis [8-11].

Several altered expression/content of surface receptors or release of inflammatory agents have been associated to PMN dysfunction during sepsis. For instance, enhanced PMN expression of CD64 was associated to depressed phagocytic activity and oxidative burst in septic patients [12]. High blood levels of pentraxin 3 (PTX3) - a PMN preformed soluble pattern recognition protein immunosuppressant - and sepsis negative outcome, were frequently correlated [13-15]. Up-regulation of PMN CD66b expression and increased PMN adhesion to the endothelium with delayed apoptosis and massive aggregation, were often observed in septic PMN [16]. IL-33 treatment in mice attenuated sepsis by promoting PMN migration to the aggressed site, and higher bloodstream concentrations of its soluble decoy isoform of ST2 (sST2) were associated with disease severity and mortality in septic patients [17]. Excessive hemopexin (HPx) and heme oxygenase-1 (HO-1) production did not only inhibit PMN migration, but also enhanced mortality in a mouse model despite their anti-oxidative role by eliminating extracellular heme [18,19].

Treatment of severe sepsis with shock, including corticosteroids (CS), can also affect PMN profile and functions. In this respect, low doses of CS (200-300 mg/day) have been often used in refractory septic shock despite decades of controversies [20]. Of note,

endogenous CS protected mice from experimental sepsis [21], adrenalectomy increased lethality after inflammatory cytokine challenge [22], and CS modulated the immunologic response to stress through suppressive and anti-inflammatory effects according to the cell type [23]. As to PMN, the glucocorticoid receptor was reported dysfunctional in sepsis [24], and CS down-regulated chemotaxis, pro-inflammatory mediators and ROS production but maintained or enhanced adhesion, phagocytosis and PTX3 [9, 25-27]. Nonetheless, little is known about the immunologic effects of low doses of CS on PMN from patients in septic shock and their impact during the early onset of the initial hit.

Therefore, the aims of the present study were to evaluate: 1) simultaneously several PMN functions *in vitro* and *in vivo*; apoptosis, adhesion, chemotaxis, phagocytosis, ROS production and degranulation, 2) expression profiles of target markers' determinants in patients admitted at the ICU ward for severe sepsis or refractory septic shock, 3) and the impact of physiological doses of CS at Day 1 & 3 following the initial hit.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This is a clinical observational and interventional study (*in vitro* and *in vivo*) of patients who were admitted to the Department of Intensive Care Unit (ICU) at the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS, Quebec, Canada) for severe sepsis and/or refractory shock. The study received the approval of our local ethical review board (Comité d'Éthique de la Recherche en Santé chez l'Humain du CHUS) and a written informed consent was obtained from patients or relatives.

Patients.

Patients were diagnosed as having severe sepsis or refractory septic shock according to the criteria of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine consensus conference [2]. 32 patients were recruited between April 2013 and January 2015, and stratified as having severe sepsis or septic shock (group 1 (G1); N = 17) and refractory septic shock (sustained shock 6-12 hr after resuscitation) receiving 300 mg/ day CS (hydrocortisone) as supportive therapy (group 2 (G2); N = 15). All patients were enrolled

within 36 hr (D1) of the onset of sepsis and met the entry criteria at the time of enrollment and 72 hr after admission (D3) at the ICU ward. Severity of illness at baseline was determined using the APACHE II score and clinical parameters were obtained. Patients with neutropenia and heart disease were excluded. Patients receiving ≤ 150 mg of hydrocortisone a day (i.e. preventive therapy) were not included. Healthy volunteers of age- and gender-matched controls (N = 17) have had only one blood sample, assuming there was no change on a three-day timeframe.

Human neutrophil isolation. Human PMN were obtained by 42 mL EDTA venous blood sampling and isolated using Polymorphprep® (Axis-Shield Diagnostics Ltd, Dundee, Scotland) density centrifugation according to the manufacturer's instructions. Purified PMN were resuspended at a concentration of 5×10^6 cells/ mL in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1 % glutamine and 1% penicillin/streptomycin and maintained at 37°C with 5% CO₂. Viability of PMN was assessed by a Trypan blue exclusion test (higher than 95% immediately after purification).

Apoptosis assay. Apoptosis of PMN was measured by flow cytometry using the Annexin V fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated and propidium iodide (PI⁺) kit (Calbiochem Oncogene Research Products, Los Angeles, CA, USA) using a FACS Calibur instrument (BD Biosciences, Mississauga, ON, CAN) according to the manufacturer's instructions. FITC-Annexin V recognizes externalized phosphatidylserine whereas PI⁺ differentiates apoptosis from necrosis. Briefly, cells at a concentration of 1×10^6 cells/ mL were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in 0.5 mL of binding buffer. FITC-Annexin V was added to the cell suspension was assessed for 15 min in the dark at room temperature. PI⁺ was then added to the cell suspension prior to analyze by cytometry. Percentage of live, early and late apoptosis or necrotic cells was measured in mean fluorescence intensity (MFI) [28].

Cell adhesion assay. Microscope glass coverslips were coated with 50 μ g/ mL fibronectin or 5 mg/ mL (0.5%) poly-D-lysine for 1 hr in a 48-well plate and washed twice with PBS before seeding PMN into wells. 2.5×10^5 isolated PMN were resuspended in RPMI with or

without fMLF (10^{-7} M) for 1 hr, washed three times in PBS and stained with KwikTMDiff solution (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA). The absorbance was measured at 605 nm with unstained cover-glass samples in HCl 0.1N using a DU-7 Spectrophotometer Beckman.

Chemotaxis assay. Cell migration of freshly isolated PMN was performed by using 12-well Boyden Chamber, as described by Fortin *et al.* [28]. Lower wells were loaded with 400 μ L of chemoattractant solution (fMLF, 10^{-7} M) in RPMI or medium alone (control) whereas 100 μ L of isolated PMN suspension (5×10^6 cells/ mL) was added to the upper wells. The chamber was incubated at 37°C for 1 hr with 5% CO₂ and the membrane was fixed and stained with a KwikTMDiff stain kit. PMN migrating toward RPMI indicating random migration served as negative control. The absorbance was measured at 605 nm with unstained membrane samples in HCl 0.1N using a DU-7 Spectrophotometer Beckman.

Phagocytic activity.

Phagocytic activity of PMN was assessed using fluorogenic particles of *Escherichia coli* (pHrodoTM *E.coli* BioParticles[®] Phagocytosis kit, Life Technologies Inc., Burlington, ON, CAN) according to the manufacturer's instructions. Briefly, whole blood was mixed with *E.coli* fluorogenic particles and incubated for 15 min at 37°C when control samples were kept on ice. Phagocytosis was stopped with ice, red blood cells were lysed with distilled water, and PMN were washed twice and resuspended in PBS prior to analyze fluorescence with a FACS Calibur instrument. Phagocytic activity of PMN was expressed as phagocytic index (PI) defined as percentage of cells that had ingested bacteria \times MFI $\times 10^{-2}$ [29].

Oxidative burst. ROS production by PMN was labelled with a commercial kit (PhagoburstTM, Glycotope Biotechnology, Heidelberg, Baden-Württemberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Whole blood was mixed with unlabelled opsonized bacteria *E. coli*, fMLF and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) as stimulants, and incubated for 10 min at 37°C. Fluorogenic substrate dihydrorhodamine (DHR) was added to samples and incubated for 10 min at 37°C. Red blood cells were lysed with

distilled water and PMN were washed twice and resuspended in PBS. The cells having produced ROS were analyzed with a FACS Calibur instrument and expressed in MFI [29].

Degranulation

Freshly isolated PMN suspended in RPMI at a concentration of 1×10^6 cells/ mL were washed in PBS and incubated for 30 min on ice with a fluorochrome-conjugated monoclonal antibody CD66b-PerCP/Cy5.5 (clone G10F5, BioLegend, San Diego, CA, USA). Cells were then fixed in 2 % paraformaldehyde fixation buffer (BD Cytfix™, BD Pharmingen, Mississauga, ON, CAN) for 10 min at room temperature. Once washed, cells were permeabilized using BD Perm/Wash™ buffer (BD Pharmingen) for 15 min on ice. Cells were washed twice and incubated for 30 min on ice with a mixture of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: PTX3-FITC (clone MNB4, Hycult biotech, Plymouth meeting, PA, USA) and HO-1-PE (clone P09601, Abcam, Toronto, ON, CAN). Isotype controls were used to quantify the non-specific background signal. Cells were washed twice in PBS prior to measurement with a FACS Canto instrument. PMN purity was assessed using an expression of CD66b marker higher than 98%.

Measurement of surface antigens and intracellular molecules expression. Freshly isolated PMN were suspended in RPMI at a concentration of 1×10^6 cells/ mL. Cells were then washed in PBS and incubated for 30 min on ice with a mixture of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: CD64-APC/Cy7 (clone 10.1) and CD66b-PerCP/Cy5.5 (clone G10F5) (BioLegend, San Diego, CA, USA); ST2/IL-1 R4-PE (clone 97203, R&D systems, Minneapolis, MN, USA); CD91-FITC (clone A2MR- α 2, BD Pharmingen). Cells were fixed in 2% paraformaldehyde (BD Cytfix™, BD Pharmingen) for 10 min at room temperature. Isotype controls were used to quantify the non-specific background signal. Cells were washed twice in PBS prior to measurement with a FACS Canto instrument. PMN purity was assessed using expression of CD66b marker higher than 98%.

Corticosteroids (CS). A 100 mg stock solution of the CS hydrocortisone (HC) 21-hemisuccinate sodium salt powder (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, CAN) in distilled water was further diluted in sterile RPMI or whole blood to a final concentration of 10^{-7} M, and

incubated with isolated PMN at 37°C for 1 hr with 5% CO₂ in RPMI before assayed following function tests and measured surface antigens and intracellular molecules expression.

Plasma cytokine measurements. Plasma was obtained from EDTA-containing blood samples and centrifuged at 2,000 g for 10 min. Levels of PTX3 and IL-1RA were quantified using high-sensitivity cytokine magnetic bead assays (Milliplex® MAP Multiplex Assays, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using the Multiplex Assay Analysis Software (EMD Millipore) [29].

Statistical analysis. The results were expressed as mean ± SD or as median with 25-75 inter-quartile range, when appropriate. Comparisons between healthy volunteers and septic patients were performed using a Mann-Whitney U test and comparisons between a patient's samples (severity and time scale) were performed using a Wilcoxon test. **P* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

General characteristics of studied patients

Data were summarized in Table 1. Thirty-two patients were studied and sampled, including 19% with severe sepsis and 81% with septic shock. The mean age in G1 (severe sepsis and non-refractory septic shock) and G2 (refractory septic shock) was similar. The median APACHE II score on admission was further elevated in G2 ($p = 0.01$ vs. G1), with higher in-hospital mortality. The most frequent sources of infection were the lung (47%) and the urinary tract (29%) in G1 with similar profile in G2. Blood cortisol levels were higher in both groups at D1 vs. D3 ($p = 0.0009$ vs. healthy volunteers). Of note, blood cortisol remained high (with or without HC infusion) in both septic groups at D3. No additional differences between survivors and non-survivors were observed in other clinical parameters (data not shown).

Table 1. Characteristics of PMN-providing subjects enrolled in this study.

	Severe sepsis & septic shock (G1) n = 17	Refractory septic shock (G2) n = 15	Healthy volunteers n = 17	p-values
Age (years)	67.1 ± 13	66.5 ± 13	73.1 ± 5	0.168
Sex, male/female, n (%)	13 (76)/4 (24)	5 (33)/10 (67)	3 (18)/14 (82)	0.0017**
APACHE II score, median (range)	20 (5-32)	28 (20-39)		0.01*
Rate of in-hospital death, n (%)	3 (17.6)	5 (33.3)		0.438
Sepsis category, n (%)				
Severe sepsis	6 (35)	0		ND
Septic shock	11 (65)	15 (100)		ND
Types of infection, n (%)				
Pneumonia	8 (47)	6 (40)		
Urosepsis	5 (29)	2 (17)		
Cholangitis	1 (6)	1 (8)		
Mediastinitis	0	1 (8)		
Esophageal-pleural perforation	0	1 (8)		0.1702
Spontaneous bacterial peritonitis	0	1 (8)		
Colitis	1 (6)	1 (8)		
Plasma cortisol level median (nM)	D1: 907 ± 369 D3: 710 ± 322	D1: 1551 ± 333 D3: 1124 ± 468	D1: 441 ± 144 MD	<0.0001† 0.0062**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, † $p < 0.0001$ G1 vs. G2 and data are expressed as median with 25-75 inter-quartile range or mean ± SD, when appropriate. Comparison of sex and between the 3 groups and types of infection between G1 and G2 was performed using a Chi-square test. Comparisons of other characteristics (APACHE II score, rate of in-hospital death and plasma cortisol level at D1 and D3) between G1 and G2 were performed using a Mann-Whitney U test. Comparison of age between the 3 groups and plasma cortisol level at D1 and D3 for each of G1 and G2 was performed using a Kruskal-Wallis test. ND, not determined. MD, missing data.

PMN apoptosis, cell adhesion & migration/chemotaxis and impact of CS

PMN viability was > 95% in both groups. An increased level of PMN apoptosis was, however, observed in septic patients (n = 31, $p = 0.0014$ vs. healthy volunteers) (Fig. 1A). *In vivo*, CS administration did not obviously influence PMN apoptosis levels in G2 group at any time-point, but the addition of CS to PMN *in vitro* (G1+CS) significantly

reduced the % of cells committed in programmed death at D1 and D3 ($n = 14, p = 0.0012$ and $n = 9, p = 0.0273$ vs. G1, respectively) (Fig. 1B).

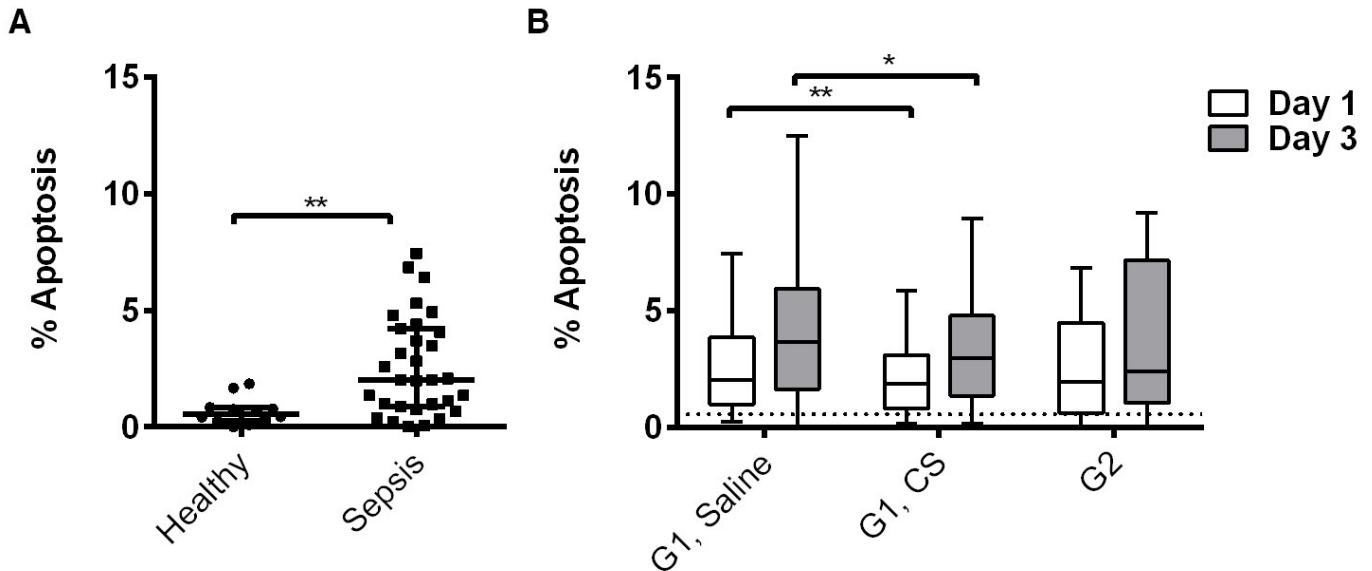


Figure. 1. Spontaneous PMN apoptosis: time-course on D1 & D3 and impact of CS.

As described in Methods. (A) PMN apoptosis (%): septic patients (G1 & G2) vs. healthy volunteers at D1. (B) PMN apoptosis (%) at D1 (white boxes) and D3 (grey boxes), from patients with severe sepsis or septic shock with (G1+CS) or without (G1) adding hydrocortisone (100 nM), and from refractory septic shock patients receiving 300 mg/day CS as supportive therapy (G2). Data represent $n = 31$ and are shown as median with interquartile range of mean fluorescence intensity (MFI) [25-75th percentiles] when compared to median value from healthy volunteers (median value in dotted lines). (A) $**p < 0.01$ vs. healthy volunteers (B) $*p < 0.05$ vs. G1+CS at D3 and $**p < 0.01$ vs. G1+CS at D1.

PMN from septic patients were stickier than those from healthy volunteers, more specifically to fibronectin-coated glass during the adhesion assays ($n = 28, p = 0.002$ vs. healthy volunteers) (data not shown), and CS administration *in vivo* or severity of sepsis further increased this adhesiveness in G2 ($n = 13, p = 0.0078$ vs. healthy volunteers) (Fig. 2). This trend was sustained at D3 following the initial hit in both G1 and G2 groups (Table

2). On the other hand, addition of CS *in vitro* did not alter the adhesion behaviour of PMN from G1 at any time-point (Table 2).

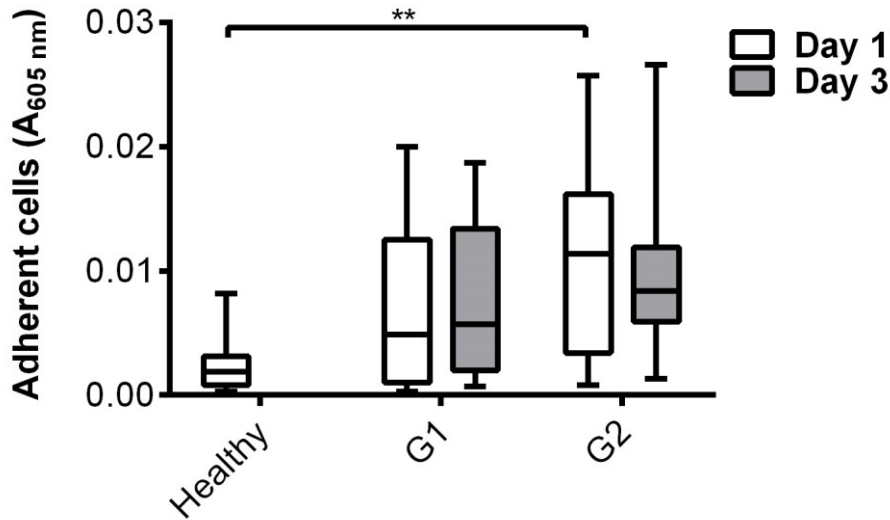


Figure. 2. PMN adhesion. As described in Methods. Adhesion of PMN (O.D. value) to fibronectin from G1 and G2 patients was measured at D1. Data represent $n = 27$ and are shown as median with inter-quartile range of absorbance [25-75th percentiles] at 605 nm compared with healthy volunteers. $**p < 0.001$ vs. healthy volunteers.

Table 2. PMN functions

Function	Day	Healthy	G1 (no CS)	G1 + CS (<i>in vitro</i> CS)	G2 (<i>in vivo</i> CS)
Adhesion (A_{605})	D1	0.0019 [0.00083-0.0031]	0.0049 [0.0010-0.0130]	0.0053 [0.0018-0.0011]	0.0114 [0.0034-0.0162]**
	D3	MD	0.0057 [0.0020-0.0134]	0.0058 [0.0006-0.0095]	0.0084 [0.0059-0.0119]
Chemotaxis (A_{605})	D1	0.3088 [0.2015-0.6508]	0.3487 [0.1227-0.6883]	0.2459 [0.0544-0.3875]	0.2147 [0.1464-0.3395]
	D3	MD	0.3961 [0.1120-0.6258]	0.0866 [0.0072-0.2182]*	0.2337 [0.1109-0.4771]
Phagocytosis (PI)	D1	170 [60-219]	19 [10-63]**	15 [8-42]	20 [8-55]**
	D3	MD	48 [4-160]	46 [28-80]	20 [11-52]
ROS production (MFI)	D1	89 [66-104]	61 [32-86]	76 [50-107]	98 [67-129]
	D3	MD	42 [29-125]	46 [33-132]	72 [68-76]

** $p < 0.05$ vs. healthy controls, * $p < 0.05$ vs. G1 and data are expressed as ranges of median absorbance at 605 nm and fluorescence intensity [25-75th percentiles]. MD, missing data.

Migration of isolated PMN from septic patients with fMLF exposure neither demonstrated obvious changes when compared with those from healthy volunteers, nor with sepsis severity (Table 2). This migration behaviour remained stable at any time-point but was affected by the addition of CS *in vitro* at D3 ($p = 0.03$ vs. G1, Table 2).

PMN phagocytosis, superoxide production, granular expression/content and impact of CS

PMN from septic patients had significantly lower phagocytic capacities to ingest *E.coli* than those from healthy volunteers (19 [8, 54] vs. 170 [60, 219] (PI), $p = 0.0005$) (Fig. 3A), with no difference with regards to sepsis severity or CS administration (Table 2), as well as between survivors and non-survivors (data not shown). This “anergy” state was still present at D3 without any improvement, and was not significantly affected by the addition of CS *in vitro* (Table 2).

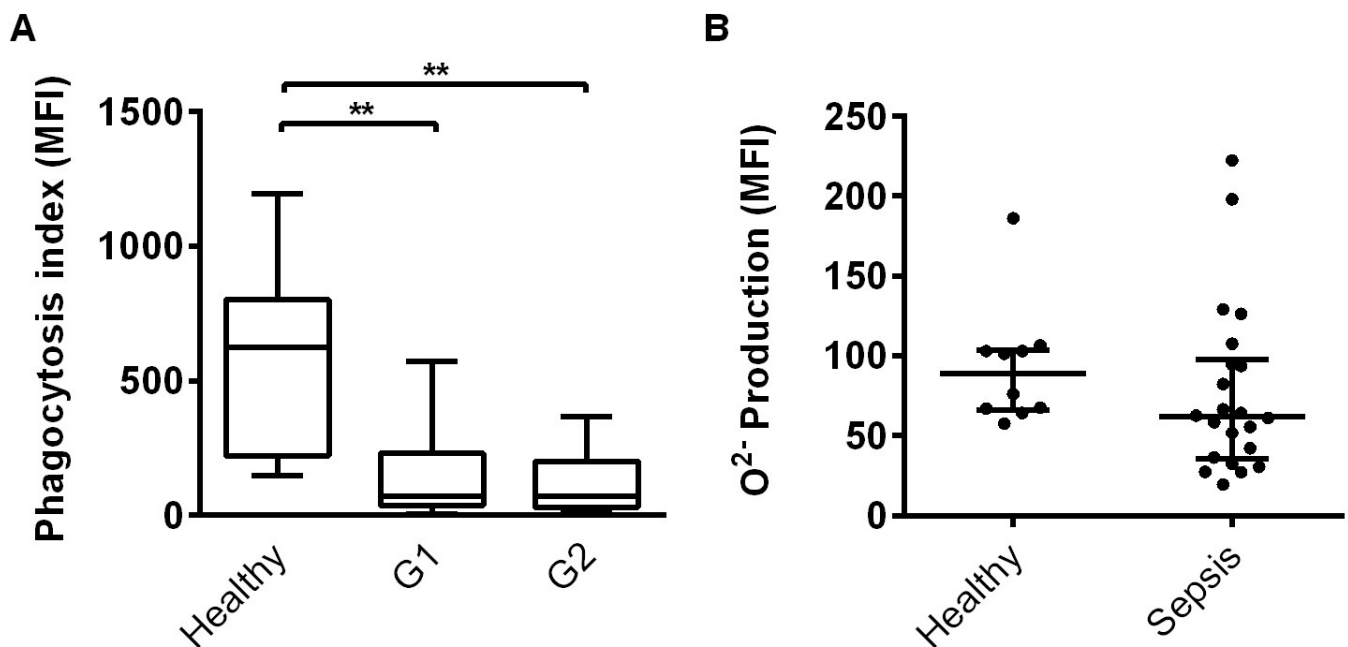


Figure 3. PMN phagocytosis and superoxide production activities. As described in Methods. (A) Phagocytosis of severe sepsis & controlled septic shock (G1); refractory septic shock receiving CS (G2), and (B) ROS production by PMN induced by *Escherichia coli* from septic patients (G1 & G2) at D1 were compared to healthy volunteers. Data

represent $n = 27$ and are expressed as median with inter-quartile range of (A) phagocytic index (PI) and (B) MFI [25-75th percentiles]. ** $p < 0.01$ vs healthy volunteers.

PMN oxidative burst was almost similar but lower in septic patients and in healthy volunteers after *E.coli* challenge (ROS production: 89 [66, 104] versus 63 [36, 108] (MFI) respectively) (Fig. 3B). No difference between survivors and non-survivors was found (data not shown). This blunted production was sustained at D3 following the initial hit (Table 2).

PTX3 expression contents were significantly higher in sepsis than in the healthy volunteers ($n = 11$, $p = 0.03$), particularly in G1 (1407 ± 1327 ng/ mL, $p = 0.02$) (Fig. 4A), and then returned similar to healthy levels at D3 (data not shown). Dynamic HO-1 expression/contents behave similarly to PTX3 with less variability and significance (Fig. 4B). Both molecule expressions tended to recover normal levels at D3 of follow-up (data not shown). Addition of CS *in vitro*, tended to increase PTX3 and HO-1 expression at D1, but levels returned to normal ranges at D3 (data not shown).

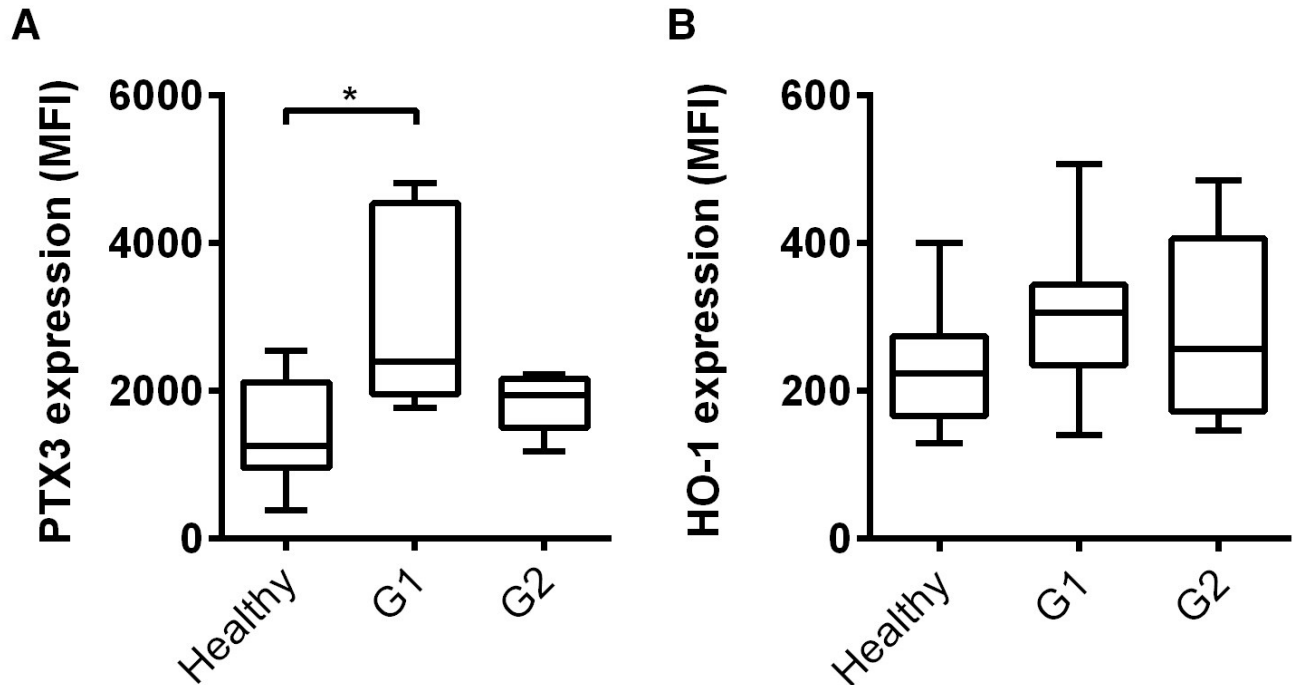


Figure. 4. PMN intracellular expression/production of PTX3 and HO-1. As described in Methods. (A) PTX3 and (B) HO-1 expression in PMN from G1 and G2 septic patients were measured at D1. Data represented $n = 11$ and are shown as median with inter-quartile range of mean fluorescence intensity (MFI) [25-75th percentiles] compared to healthy volunteers. $*p < 0.05$ vs. healthy volunteers.

Expression of innate immune receptors involved in PMN function and impact of CS

PMN expression of CD64 was strongly increased in both G1 & G2 compared to those from healthy volunteers (444 ± 193 vs. 201 ± 63 (MFI), $p < 0.0001$) (Fig. 5A). No significant differences were noted, however, between survivors and non-survivors (data not shown), or G1 vs. G2 (Fig. 5A). CD64 expression of G2 significantly diminished between D1 and D3 ($p = 0.03$), but remained higher than the level observed for the healthy volunteers (Fig. 5B). Adding CS *in vitro* tended to decrease the expression of CD64 at both D1 and D3, but as for G2, the expression level remained above to that of healthy volunteers (data not shown).

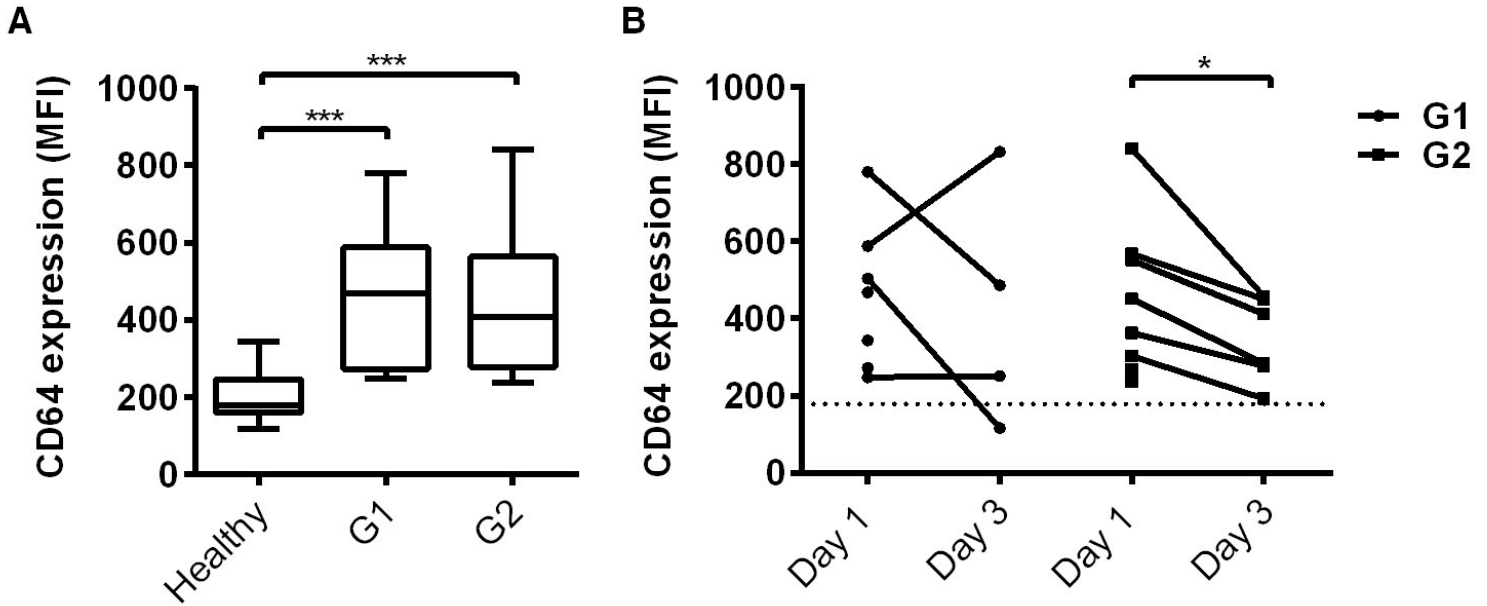


Figure. 5. CD64 PMN expression. As described in Methods. (A) CD64 PMN expression from G1 and G2 patients were measured at D1, and compared to healthy volunteers, and (B) individual time-course (D1-to-D3). Data represent $n = 15$ and are expressed as median with inter-quartile range of mean fluorescence intensity (MFI) [25-75th percentiles] and compared to median value from healthy volunteers (median value in dotted lines). $**p < 0.0001$ vs. healthy volunteers, $*p < 0.05$ between D1 and D3.

Cell-surface molecule CD66b was over-expressed in G1 septic PMN compared to the healthy volunteers ($n = 13$, $p = 0.0169$) (Fig. 6). However, this profile was irrespective of sepsis severity or CS *in vivo* administration and was unchanged at D3 (Fig. 6 and data not shown).

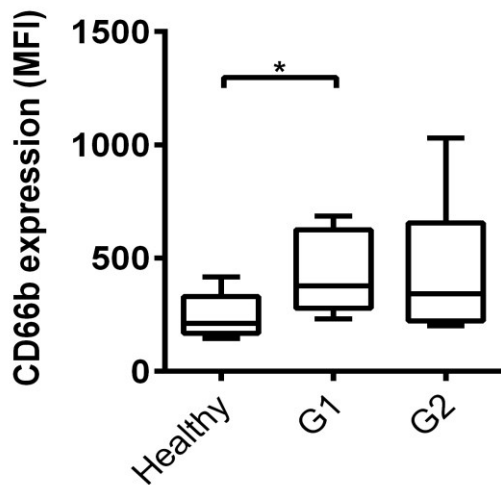


Figure. 6. CD66b PMN expression. As described in Methods. PMN CD66b expression on PMN from G1 and G2 patients were measured at D1, and compared to healthy volunteers. Data represent $n = 13$ and are shown as median with inter-quartile range of mean fluorescence intensity (MFI) [25-75th percentiles] compared with healthy volunteers. * $p < 0.05$ vs. healthy volunteers.

More ST2 receptors were expressed on septic PMN ($n = 16$, $p = 0.0015$ vs. healthy volunteers) and more specifically in G2 at D3 (Table 3), eventually suggesting a disease severity and/or CS treatment relationship. CD91 expression did not move in any group at any time-point (Table 3).

Table 3. PMN receptor expression profiles

Marker	Day	Healthy	G1 (no CS)	G1 + CS (<i>in vitro</i> CS)	G2 (<i>in vivo</i> CS)
CD91	D1	147 [133, 163]	134 [119, 140]	127 [106,171]	131 [119, 180]
	D3	ND	139 [129, 148]	159 [139, 179]	130 [120, 143]
ST2	D1	133 [120, 143]	178 [129, 406]*	175 [142, 246]	193 [161, 295]*
	D3	ND	176 [114, 263]	174 [117, 288]	264 [182, 412]
CD66b	D1	212 [168, 330]	377 [278, 626]*	379 [253, 631]	343 [223, 656]
	D3	ND	744 [512, 976]*	828 [511, 1144]	497 [220, 775]

* $p < 0.05$ vs. healthy volunteers and data are expressed as ranges of MFI [25-75th percentiles]. ND, not determined.

CD66b, ST2 and CD91 expressions were not affected by the addition of CS *in vitro* (Table 3).

In parallel pro- and anti-inflammatory cytokine blood contents

PTX3 and IL-1RA blood contents were significantly higher in G1 & G2 septic patients ($p = 0.0318$ and $p < 0.0001$ vs. healthy volunteers, respectively) (Fig. 7A) but both tended to return to the normal range at D3 ($p = 0.0273$ and $p = 0.0313$, respectively) (Fig. 7B). Similar profile and time-course were observed with IL-1RA blood concentrations (Fig. 7C-D).

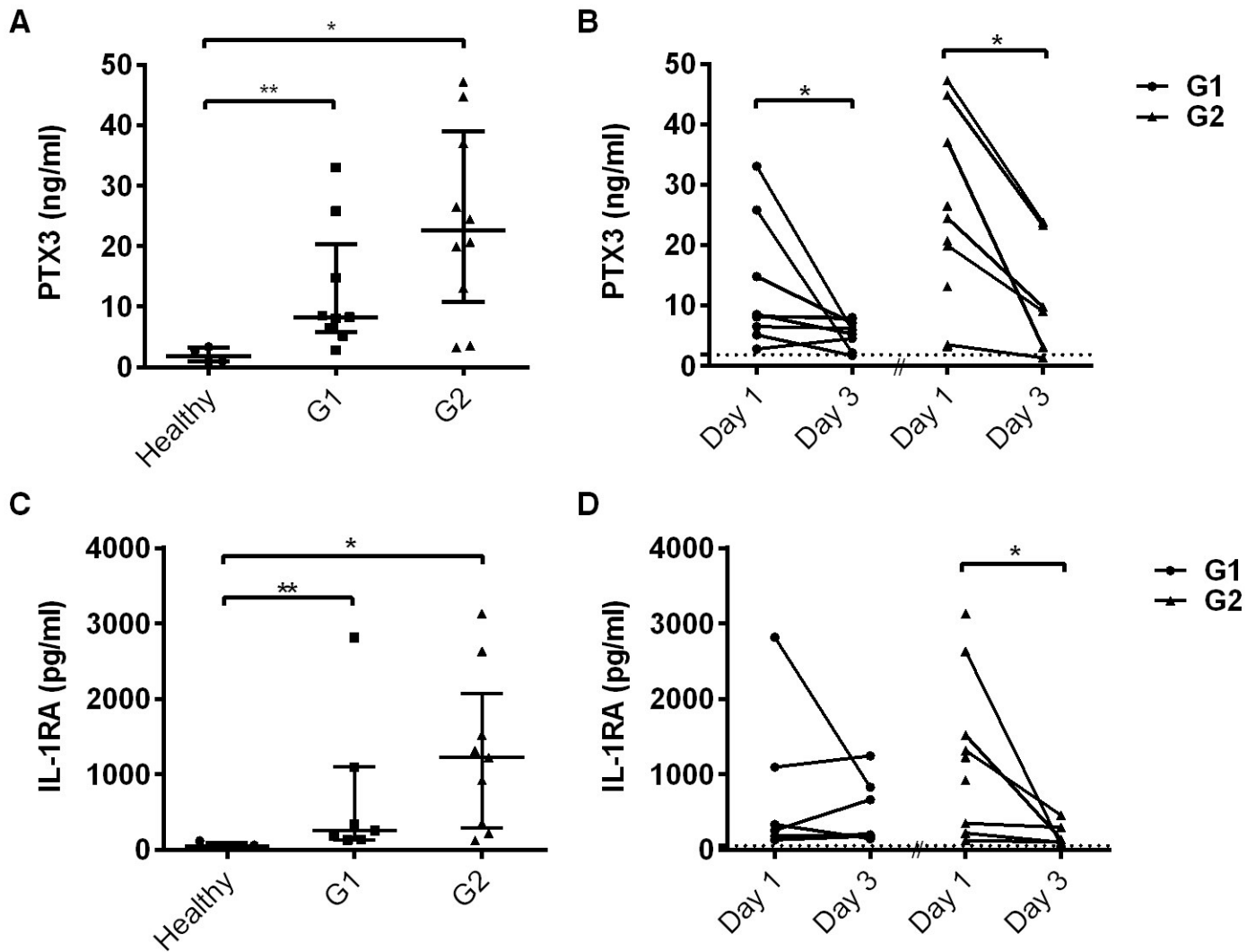


Figure. 7. PTX3 and IL1-RA bloodstream contents. As described in Methods. Plasma levels of (A) PTX3 and (C) IL-1RA from G1 and G2 patients were measured at D1 and compared to healthy volunteers. (B-D) respective individual time-course of values (D1-to-D3) and compared to the healthy volunteers (median value in dotted lines). Data represent $n = 19$ and are shown as median with inter-quartile range of mean [25-75th percentiles]. (A&C) $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ vs. healthy volunteers (B&D) $*p < 0.05$ between D1 and D3.

DISCUSSION

The implication of PMN in host defence deterioration in sepsis has been demonstrated in previous studies investigating their functions and phenotype profile [9,30]. In the present study, we showed an impaired recruitment ability of PMN to the infectious site as well as in other effector functions depending upon the severity of sepsis and their time course 3 days following the initial hit. A better overview of the impact of sepsis on PMN can be observed in this work, together with an assessment of the *in vitro* and *in vivo* impacts of a HC addition/treatment on PMN behaviour and phenotype profile in septic patients.

Even if PMN have been first reported with an extended lifetime in circulation and are supposed to be massively recruited to the infectious site in sepsis, their migration is often impaired and associated with a poor outcome of patients [6,10,31-33]. Overall, we have indeed observed a low rate of apoptosis maintained during 3 days in PMN from septic patients when compared with healthy volunteers despite an increased difference in patient groups. Suppressing the cell death program could be the consequence of overwhelming inflammatory signals such GM-CSF, IL-8 or bacterial constituents, or an impaired intrinsic apoptotic pathway [34]. In fact, it was described in septic patients that the relocation/cleavage of the nuclear factor MNDA (myeloid nuclear differentiation antigen) and CD24-triggered caspase-dependent apoptosis were impaired [33,34].

An increased adhesion activity of PMN associated with enhanced CD66b expression which is a granulocyte-specific activation antigen for exocytosis of specific granule proteins such as PTX3, has been described in septic patients [16]. In this respect, our results demonstrated that the over-expression of CD66b was accompanied by a high PTX3 expression in PMN as well as in bloodstream and maintained up to 3 days after onset in patients. These data suggest that an overwhelming release of PTX3 could not only promote the removal of pathogens by opsonization, but also attenuate PMN recruitment at inflammatory sites by binding P-selectin [14]. In parallel, low blood concentrations of PTX3 (2 ng/mL) observed in healthy volunteers can rapidly increase in response to inflammation and infection [15]. Transient high peak levels of PTX3 and IL-1RA were found in our septic patients, and tended to return to basal values after 3 days as it was

reported [15,42]. Both aforementioned works confirmed these cytokines dynamic changes linked with disease severity or progression, as we did.

According to our results, sepsis did not obviously affect the chemotactic response of circulating PMN after a fMLF stimulus, during the first 3 days of sepsis, as observed by Cummings *et al.* [35]. Furthermore, no association were observed with the outcome. In contrast with this data, Tavares *et al.* found an impairment of chemotaxis in septic patients which was directly correlated with a poor prognosis [10]. These discordant chemotactic responses of PMN to fMLF may be related to the heterogeneity of patients (average age, period of admission following the initial hit, sources of infection, average APACHE II score). Additionally, an excessive production/presence of other confounding molecules may impair the recruitment of PMN. It has been shown that both HPx in excess and over-expressed HO-1 inhibit PMN migration *in vitro* in a septic mouse model [17,18]. In this work, there was no enhanced expression of CD91 in PMN from septic patients. This may suggest that receptors were saturated with high levels of HPx in plasma (not measured herein). A slight trend of increased PMN HO-1 expression was indeed observed in septic patients, particularly in G1, but disappeared after 3 days. This may suggest that the inhibitory effect of HO-1 on PMN migration was transient. An enhanced PMN ST2 expression was also noted in septic patients which is known to inhibit the internalization of chemokine receptors by blocking GRK2 induction [16]. PMN tended to have a higher ST2 expression specifically in G2 at D3, which means that the severity of sepsis (or CS administration) could have influenced ST2 expression. A possible explanation is that ST2 expression is not necessarily deregulated in earlier phases of sepsis, but occurred in the following days without recovering normal levels.

Failure in PMN phagocytosis from septic patients has been reported in several experimental studies [9,12]. An over-expression of CD64 on PMN from septic patients was known to be associated with depressed PA [12]. Our results showed such a lower cellular activity which persisted at least the first 3 days of sepsis, independently of the severity of the disease. Both PMN CD64 and PTX3 expressions which are involved mediators of phagocytosis, were studied by neither one showed any correlation with PMN phagocytosis [13,14]. PMN CD64 expression was observed higher in severe sepsis and controlled septic shock than in refractory shock, with a negative association to APACHE II score. This may

suggest that high expression of CD64 on PMN in sepsis is not necessarily predictive of adverse outcomes. We could not find any predictive role for PA neither as it was already described. No clear explanation was found as to why this decreased PMN phagocytosis neither correlated with traditional markers' expressions nor with the outcome. However, the increased PMN expressions of CD64 and PTX3 were assumed to be enough to compensate this blunted phagocytosis.

Many studies have observed an increased PMN oxidative response in septic patients while other ones demonstrated the opposite [7,9,36,37]. Again, these contradictory data may be related to differences in applied techniques, heterogeneity in selected patients and the nature of activating stimuli [9]. Our results, in agreement with Demaret *et al.* indicated that ROS production was depressed in sepsis [37]. An afflicted ROS production in sepsis could reflect the exhaustion/desensitization of PMN which were continually exposed to inflammatory cytokines and other mediators. This “anergic” paralysis was sustained up to day 3 from the onset of sepsis, according our results. Decreased production of ROS and PA in sepsis could be the result of an impaired signal transduction in PMN like an attenuation of PI3K or ERK1/2 activation pathways [29].

As to the impacts of CS on PMN functionalities, Cox *et al.* already described an inhibitory effect on apoptosis in PMN, as we in our work [38], -driven decreasing of chemotaxis and phagocytosis [20]. We noted that low doses of CS had no additional effect on already exhausted PA of PMN *in vitro* at D1 as well as at D3 but decreased chemotaxis of these at D3 [9]. In several studies, the use of physiological doses of CS allowed to decrease ROS production in over-activated PMN, and pro-inflammatory mediator expression/content [9,25,26,39], but not in another one [40], whereas we observed even more an increased oxidative burst with *in vitro* CS treatment in severe sepsis and controlled septic shock patients. As the levels of ROS were already depressed by sepsis in our hands, CS may not have had a superimposed effect on PMN during a 3 days-period of treatment, but different results could have occurred with a longer treatment. Furthermore, the assigned physiological dose of CS and period of exposure on PMN *in vitro* might not have been appropriate for individual needs. CS do not only acts as inflammatory inhibitors, but also increase components of complement, selected proteins in extracellular matrix and PTX3 [41]. However, although CS tended to increase PTX3 and HO-1 PMN expressions in sepsis

at D1 in our hands, no clear influence was observed on CD66b, ST2 and CD91 expressions in septic patients.

Study Limitations

The time window for the inclusion up to 36 h following admission at the ICU ward for Day 1, was a limitation but was justified by the organizational and technical obligation to sample patients no later than on early morning the day on, because the need of numerous subsequent procedures for the assays. In fact, the convenience sample might have led to compare different stages of evolution in patients inside each patient group. The refractory shock group differed from the controlled septic one by not only one but two variables (i.e. diseases severity index and administration of CS), so that sometimes associations cannot be definitively established in several functional or phenotypic observations. Additionally, our cohort had a relatively small number compensated by multiple variables.

CONCLUSIONS

This work demonstrates that PMN functions and expression markers are hugely disturbed during the early phases of severe sepsis & septic shock and refractory shock. This “immune paralysis” of PMN observed in most of patients, increases with the severity of sepsis and is sustained up to three days following ICU admission. CS either administered *in vivo* or added *in vitro* might be able to modulate some of these functional and expression alterations with unclear resulting outcome.

AUTHORSHIP

J.L. participated in recruitment of the patients, designed and performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. A.L. and K.B. collaborated to the experiments. A.L., T.F. and O.L. provided feedback on the manuscript. O.L. and T.F. supervised the project, participated in the analysis of the data, edited the final version of the manuscript, conceived and designed of the study. O.L. recruited the patients and healthy volunteers were recruited by T.F.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the CRCEL-CHUS (PAFI). The authors would like to particularly thank Éliette Théberge and Odette Baril for their technical assistance in the recruitment of healthy volunteers and the nursing staff of the ICUs for the blood collection.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

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* **29**: 1303–1310.
2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**: 1644–1655.
3. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**: 617–653.
4. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* **2**: 965–975.
5. Santus P, Corsico A, Solidoro P, Braido F, Di Marco F, Scichilone N (2014) Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. *COPD* **11**: 705–717.
6. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ (2008) The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* **30 Suppl 1**: 3–9.
7. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomão R (2003) Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* **20**: 208–212.
8. Santos SS, Brunialti MKC, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R (2012) Generation of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Monocytes From Septic Patients and Association With Outcomes. *Shock* **38**: 18–23.
9. Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Chouker A, Peter K, Thiel M (2006) Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. *Shock* **26**: 254–261.
10. Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CHB, Murta EFC, Ferreira SH, Cunha FQ (2002) Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med* **30**: 1056–1061.
11. Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, Milani AR, Rodrigues Filho EM, Ladniuk RM, Pierozan P, de Moura RM, Prolla JC, Vachon E, et al. (2006)

- Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* **10**: r155.
12. Hirsh M, Mahamid E, Bashenko Y, Hirsh I, Krausz MM (2001) Overexpression of the high-affinity Fcγ receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis. *Shock* **16**: 102–108.
 13. Bonacina F, Baragetti A, Catapano AL, Norata GD (2013) Long pentraxin 3: experimental and clinical relevance in cardiovascular diseases. *Mediators Inflamm* **2013**: 725102.
 14. Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V, Cuccovillo I, Bastone A, Gobbi M, Valentino S, et al. (2010) Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol* **11**: 328–334.
 15. Uusitalo-Seppälä R, Huttunen R, Aittoniemi J, Koskinen P, Leino A, Vahlberg T, Rintala EM (2013) Pentraxin 3 (PTX3) is associated with severe sepsis and fatal disease in emergency room patients with suspected infection: a prospective cohort study. *PLoS One* **8**: e53661.
 16. Schmidt T, Zündorf J, Gröger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J, Schnitzler N. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *J Leukoc Biol*. 2012 **91**:791-802.
 17. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, McKenzie AN, Xu D, Cunha FQ, et al. (2010) Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med* **16**: 708–712.
 18. Spiller F, Costa C, Souto FO, Vinchi F, Mestriner FL a C, Laure HJ, Alves-Filho JC, Freitas A, Rosa JC, Ferreira SH, et al. (2011) Inhibition of neutrophil migration by hemopexin leads to increased mortality due to sepsis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* **183**: 922–931.
 19. Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD, Neto AF, Ferreira SH, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ (2006) Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br J Pharmacol* **149**: 345–354.
 20. Annane D, Bellissant E, Bollaert P-E, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, Keh D, Kupfer Y, Oppert M, Meduri GU (2009) Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA* **301**: 2362–2375.

21. Li CC, Munitic I, Mittelstadt PR, Castro E, Ashwell JD. Suppression of Dendritic Cell-Derived IL-12 by Endogenous Glucocorticoids Is Protective in LPS-Induced Sepsis. *PLoS Biol.* 2015;**13**:e1002269.
22. Bertini R, Bianchi M, Ghezzi P. Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1988;**167**:1708-12.
23. Baschant U, Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 May 31;**120**:69-75.
24. Bergquist M, Jirholt P, Nurkkala M, Rylander C, Hedenstierna G, Lindholm C (2014) Glucocorticoid receptor function is decreased in neutrophils during endotoxic shock. *J Infect* **69**: 113–122.
25. Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, Volk H-D, Doecke W-D, Falke KJ, Gerlach H (2003) Immunologic and hemodynamic effects of ‘low-dose’ hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 512–520.
26. Kaufmann I, Briegel J, Schliephake F, Hoelzl A, Chouker A, Hummel T, Schelling G, Thiel M (2008) Stress doses of hydrocortisone in septic shock: beneficial effects on opsonization-dependent neutrophil functions. *Intensive Care Med* **34**: 344–349.
27. Heller AR, Heller SC, Borkenstein A, Stehr SN, Koch T (2003) Modulation of host defence by hydrocortisone in stress doses during endotoxemia. *Intensive Care Med* **29**: 1456–1463.
28. Fortin CF, McDonald PP, Lesur O, Fülöp T (2008) Aging and neutrophils: there is still much to do. *Rejuvenation Res* **11**: 873–882.
29. Baëhl S, Garneau H, Le Page A, Lorrain D, Viens I, Svoltelis A, Lord JM, Phillips AC, Cabana F, Larbi A, et al. (2015) Altered neutrophil functions in elderly patients during a 6-month follow-up period after a hip fracture. *Exp Gerontol* **65**: 58–68.
30. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos C a. (2008) Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin Exp Immunol* **154**: 87–97.
31. Muller Kobold a C, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW (2000) Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* **26**: 883–892.
32. Paunel-Görgülü A, Kirichevska T, Lögters T, Windolf J, Flohé S (2012) Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. *Mol Med* **18**: 325–335.

33. Parlato M, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Philippart F, Misset B, Adib-Conquy M, Cavaillon J-M (2014) CD24-triggered caspase-dependent apoptosis via mitochondrial membrane depolarization and reactive oxygen species production of human neutrophils is impaired in sepsis. *J Immunol* **192**: 2449–2459.
34. Milot E, Fotouhi-Ardakani N, Filep JG (2012) Myeloid nuclear differentiation antigen, neutrophil apoptosis and sepsis. *Front Immunol* **3**: 397.
35. Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, Hagen TR, Steinberg KP, Goodman RB (1999) Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol* **162**: 2341–2346.
36. Wenisch C, Parschalk B, Patruta S, Brustbauer R, Graninger W (1999) Effect of polyclonal immunoglobulins on neutrophil phagocytic capacity and reactive oxygen production in patients with gram-negative septicemia. *Infection* **27**: 183–186.
37. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis M-A, Plassais J, Jallades L, Malcus C, Poitevin-Later F, Textoris J, Lepape A, et al. (2015) Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol* **29**: pii: jlb.4A0415-168RR. [Epub ahead of print].
38. Cox G (1995) Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* **154**: 4719–4725.
39. Békési G, Kakucs R, Várbíró S, Rácz K, Sprintz D, Fehér J, Székács B (2000) In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids* **65**: 889–894.
40. Levine PH, Hardin JC, Scoon KL, Krinsky NI (1981) Effect of corticosteroids on the production of superoxide and hydrogen peroxide and the appearance of chemiluminescence by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* **5**: 19–27.
41. Doni A, Mantovani G, Porta C, Tuckermann J, Reichardt HM, Kleiman A, Sironi M, Rubino L, Pasqualini F, Nebuloni M, et al. (2008) Cell-specific regulation of PTX3 by glucocorticoid hormones in hematopoietic and nonhematopoietic cells. *J Biol Chem* **283**: 29983–29992.
42. Arnalich F, López J, Codoceo R, Jim nez M, Madero R, Montiel C (1999) Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survival in sepsis and septic shock. *J Infect Dis* **180**: 908–911.

DISCUSSION

Malgré que le recrutement des PMN ainsi que leur infiltration soient essentiels à la défense de l'hôte contre les pathogènes et la réparation tissulaire, ceux-ci peuvent également être à l'origine de dommages tissulaires comme il est observé dans le sepsis (Kaufmann *et al.*, 2006). Plusieurs études ont mis en lumière l'implication des PMN dans la détérioration de la défense de l'hôte en observant leurs fonctions et leur profil phénotypique (Kaufmann *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2008). Toutefois, il est à noter que la plupart de ces études cliniques ont évalué certaines fonctions particulières telles que la phagocytose ou la production de ROS et non dans leur ensemble. La présente étude a pour but de permettre une meilleure vue d'ensemble de l'implication du sepsis sévère et du choc septique réfractaire, simultanément sur plusieurs autres fonctions majeures et le profil phénotypique des PMN. De surcroît, cette étude a observé comment l'administration de doses physiologiques d'hydrocortisone (300 mg/jour) *in vitro* et *in vivo* influence le comportement des PMN, lequel est réévalué à la troisième journée suivant l'admission des patients.

Apoptose des PMN au cours du sepsis

Ainsi, le sepsis module la durée de vie des PMN en prolongeant celle-ci (c'est-à-dire en retardant la mort cellulaire programmée ou apoptose) dans la circulation sanguine, ce qui aura pour conséquence de provoquer un recrutement massif de PMN au site infectieux (Alves-Filho *et al.*, 2008; Paunel-Görgülü *et al.*, 2012). Bien qu'ils y soient plus nombreux afin de gérer la clairance des agresseurs, leur migration est malheureusement souvent défailante et associée à un mauvais pronostic chez les patients (Muller Kobold *et al.*, 2000; Tavares-Murta *et al.*, 2002). Leur présence excessive peut conduire à la production d'agents oxydatifs qui sont dommageables non seulement pour les pathogènes, mais également pour les tissus de l'hôte infecté. Selon cette étude, une augmentation significative de l'apoptose a été notée chez les deux groupes de patients atteints de sepsis sévère et choc septique, comparés aux contrôles sains. Il a été observé que ce comportement persiste jusqu'à J3. Il faut toutefois souligner que le pourcentage absolu de cellules en état apoptotique n'excède pas en moyenne 5 %, ce qui crée une très faible

variation entre les groupes de patients et les contrôles sains. Puisqu'aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes de patients, ceci pourrait suggérer que la sévérité du sepsis n'a pas d'effet sur l'apoptose des PMN dans la phase précoce de la maladie. En dépit de la viabilité des PMN qui est plus élevée chez les sujets sains, le retard de l'apoptose des PMN perçu chez les patients au cours des premières journées de la maladie pourrait être la conséquence d'une vague accablante de signaux inflammatoires, tels que le GM-CSF, l'IL-8 ou des composés bactériens, reconnus pour leur effet anti-apoptotique. Il est également possible que ce retard soit à l'origine d'un dysfonctionnement de la voie intrinsèque de l'apoptose. En effet, Milot *et al.* ont noté que la relocalisation/clivage du facteur nucléaire MNDA (*myeloid nuclear differentiation antigen*) est défaillante chez les patients septiques (Milot *et al.*, 2012). Le contrôle du maintien d'un équilibre adéquat de l'apoptose est donc essentiel chez les patients afin de permettre l'élimination des agresseurs tout en limitant les effets collatéraux des PMN sur les tissus.

Augmentation de l'adhésion des PMN associée à une forte expression de CD66b et PTX3 lors du sepsis

L'augmentation de l'adhésion des PMN a été associée avec une expression à la hausse de CD66b chez les patients septiques (Schmidt *et al.*, 2012). La même tendance a été observée dans cette étude et persiste durant au moins les trois premières journées de sepsis, malgré le fait que la sévérité du sepsis n'influence pas l'adhésion des PMN, ni l'expression de CD66b. Le récepteur CD66b est non seulement un indicateur de l'adhésion des PMN, mais aussi de l'exocytose de protéines contenues dans les granules spécifiques, telle que la PTX3. Celle-ci est reconnue pour être hautement produite autant dans les granules que dans la circulation sanguine chez les patients atteints de sepsis et associée à la sévérité de la maladie (Bastrup-Birk *et al.*, 2013). Les résultats obtenus ont démontré que la surexpression de CD66b est reliée à une forte expression de PTX3, ainsi qu'à des niveaux élevés dans la circulation sanguine. Comme la PTX3 est reconnue pour jouer un rôle d'inhibiteur compétitif de l'adhésion des PMN en se liant aux sélectines-P, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la production et de la libération de PTX3 ne favorisent pas seulement l'élimination des pathogènes par opsonisation, mais pourrait participer

également à l'atténuation du recrutement des PMN aux sites d'infection par une boucle de rétroaction (Deban *et al.*, 2010).

Chimiotactisme des PMN non affecté dans la phase initiale du sepsis

Selon les résultats obtenus, le sepsis sévère ainsi que le choc septique, réfractaire ou non, n'affecte pas le chimiotactisme des PMN suite à une stimulation de fMLF, au cours des trois premières journées de la maladie. Dans le même ordre d'idée, il a été décrit selon l'étude de Cummings *et al.* que les PMN des patients septiques avaient également une réponse chimiotactique normale avec le même stimulus (Cummings *et al.*, 1999). Par contre, Tavares-Murta *et al.* ont démontré que le chimiotactisme des PMN de patients septiques est déficient et corrèlent directement à un mauvais pronostic (Tavares-Murta *et al.*, 2002). Aucune association n'a été toutefois observée dans cette étude. Il est possible que les différentes réponses chimiotactiques des PMN au fMLF soient dues à l'hétérogénéité des patients (la moyenne d'âge, la période d'admission suivant le choc initial, la moyenne du score APACHE II). De plus, il est connu que la migration des PMN peut être perturbée par la production excessive de certaines autres molécules. En effet, il a été démontré chez des modèles murins de sepsis qu'un excès d'HPx inhibe la migration des PMN *in vitro* (Spiller *et al.*, 2011). Relié au processus de la dégradation de l'hème, l'HO-1 est également une molécule impliquée dans le dysfonctionnement de la migration et l'adhésion des PMN lorsqu'elle est produite en excès chez des modèles murins (Freitas *et al.*, 2006). Chez les PMN des patients septiques de cette étude, aucune augmentation de l'expression de CD91 n'a été observée. Ceci suggère que les récepteurs sont saturés par un niveau élevé d'HPx dans le plasma. De plus, l'expression d'HO-1 tend légèrement à augmenter chez les patients, en particulier dans le G1, mais cette différence disparaît après 3 jours. Il serait possible que les effets inhibiteurs d'HO-1 soient transitoires sur la migration et ne se produisent qu'à la phase aigüe du sepsis. L'augmentation de l'expression de ST2, lequel inhibe l'internalisation de récepteurs à chimiokines en bloquant l'activation de GRK2, a également été observée chez les patients septiques (Alves-Filho *et al.*, 2010). L'expression de ST2 tend à être plus élevée chez les PMN de G2, ce qui signifie que la sévérité du sepsis influencerait ce récepteur impliqué dans la migration des PMN. Elle tend également à augmenter chez G2 après 3 jours, alors qu'il n'y aucune différence chez G1.

Ceci pourrait suggérer que l'expression de ST2 n'est pas nécessairement débalancée dans les premières journées de sepsis, mais le devient dans les jours suivant sans revenir à un niveau normal.

Phagocytose et production de ROS atténués par le sepsis

Certaines fonctions effectrices sont profondément affectées chez les patients septiques, dont la phagocytose qui est largement décrite dans plusieurs études (Hirsh *et al.*, 2001; Kaufmann *et al.*, 2006). Il est décrit selon Hirsh *et al.* qu'une surexpression de CD64 à la surface des PMN est associée à une activité phagocytaire (PA) et une flambée oxydative déficientes chez les patients septiques (Hirsh *et al.*, 2001). Cette étude a également démontré que ces deux fonctions sont perturbées par le sepsis et ne sont pas affectées davantage par la sévérité de la maladie, étant donné qu'elles sont déjà esquivées par celle-ci. Cette paralysie qui est constatée jusqu'à maintenant par le biais de plusieurs fonctions majeures, persiste au moins jusqu'aux trois premières journées suivant le choc initial du sepsis selon les données recueillies dans cette étude. Les associations décrites dans la littérature entre l'expression de marqueurs inflammatoires chez les PMN comme CD64 et PTX3, et la PA, ont été vérifiées (Deban *et al.*, 2010; Bonacina, Baragetti, Catapano, & Norata, 2013). Toutefois, aucune corrélation n'a été observée avec la PA. Il est à noter que l'expression de CD64 était plus élevée chez G1 que G2. De surcroît, plus son expression était élevée, plus le score APACHE II diminuait. Ceci pourrait suggérer qu'une forte expression de CD64 n'est pas nécessairement un indicateur d'un pronostic négatif.

Chez les patients septiques, plusieurs études ont observé une hausse de la réponse oxydative chez les PMN par rapport aux sujets sains, alors que d'autres ont démontré le contraire (Wenisch *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2003; Kaufmann *et al.*, 2006). Il serait possible que ces résultats contradictoires soient dus à l'hétérogénéité et au statut clinique des patients, au même titre des autres fonctions neutrophiliques. Il faut également tenir compte de la nature du stimulus permettant l'activation des PMN, puisque le niveau de ROS produits en est dépendant (Kaufmann *et al.*, 2006). Dans la présente étude, malgré qu'une stimulation des PMN par PMA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*) et *Escherichia coli* augmente la production de ROS chez les patients septiques, leur niveau reste inférieur

à celui des contrôles sains. Ces résultats qui vont de pair avec ceux décrits par Wenisch *et al.*, démontrent une production de ROS et une PA affaiblis des PMN par le sepsis (Wenisch *et al.*, 1999). Toutefois, cette conclusion est controversée par d'autres études qui stipulent que le déclin de la PA des PMN est associé à une augmentation de la flambée oxydative (Kaufmann *et al.*, 2006). L'épuisement de la production de ROS pourrait être dû à l'activation persistante des PMN qui sont continuellement exposés à des cytokines et autres médiateurs inflammatoires. Selon les résultats obtenus, cette paralysie est soutenue pendant au moins les 72 premières heures suivant le choc initial. Il est également possible que l'affaissement de la production des ROS et de la PA soit le reflet d'un dysfonctionnement au niveau de la transduction signalétique des PMN.

Effets des CS sur les fonctions des PMN et leur profil phénotypique au cours du sepsis

Comme il a été précédemment décrit, les CS sont connus pour avoir un effet anti-apoptotique sur les PMN (Cox, 1995). Dans la présente étude, un tel comportement a été observé lors de l'ajout *in vitro* de CS aux PMN appartenant au G1, que ce soit à J1 ou J3. Contrairement à une diminution anticipée du chimiotactisme des PMN par les CS, un niveau comparable aux sujets sains a été observé au cours des trois premières journées de sepsis chez les patients (Annane *et al.*, 2009). L'ajout de CS *in vitro* n'influence pas la PA des PMN jusqu'à J3 tel que rapporté (Kaufmann *et al.*, 2006). Les CS affectent non seulement les fonctions des PMN, mais atténuent aussi les effets des médiateurs pro-inflammatoires (Keh *et al.*, 2003). Il a été observé qu'un traitement *in vitro* de CS chez les patients septiques tend à diminuer l'expression de CD64 dont le niveau restait supérieur à celui des témoins à J3. Malgré que les CS sont reconnus pour être des suppresseurs inflammatoires, ils ont également la propriété d'augmenter les composés du complément, certaines protéines de la matrice extracellulaire, ainsi que le niveau sanguin de PTX3 (Doni *et al.*, 2008). Or, le résultat attendu n'a pas été observé au niveau de l'adhésion et de l'expression de CD66b des PMN. D'ailleurs, l'administration de CS n'a occasionné aucun effet *in vitro* ou *in vivo* sur l'expression de ST2 et CD91 chez les PMN de patients septiques. Cependant, ce traitement avait tendance à augmenter l'expression de PTX3 et HO-1 des patients à J1. Au contraire, l'administration de CS *in vivo* pourrait être à l'origine de la diminution de l'expression de PTX3 chez G2, dont la gravité de la maladie est plus

élevée. Cette tendance a été observée si on exclut les patients atteints de sepsis sévère dans le G1, afin de comparer un niveau de sévérité similaire chez ceux-ci. Plusieurs auteurs ont démontré que les propriétés immunosuppressives de CS pouvaient contribuer à diminuer la production de ROS excessive des PMN chez les patients septiques (Kaufmann *et al.*, 2006; Békési *et al.*, 2000). Dans le même sens que l'étude de Levine *et al.*, les résultats obtenus indiquent toutefois que le traitement de CS n'influence pas *in vitro*, ni *in vivo* la production de ROS chez les patients (Levine *et al.*, 1981). Comme la production de ROS est déjà atténuée par le sepsis, il est probable que les CS n'aient pas d'effet additionnel sur les PMN des patients au cours de la période de trois jours observée. Néanmoins, certains résultats contradictoires, tels qu'une augmentation significative de la production de ROS suite à l'ajout *in vitro* de CS par rapport à G1, ont été observés. Il est plausible que cette différence puisse être due à la nature et au temps de stimulation des PMN. Il est également possible qu'il puisse y avoir un biais au niveau de l'activation des PMN qui y sont hautement susceptibles durant leur manipulation, ce qui aurait pu provoquer une surévaluation de la production de ROS. Il est important de mentionner que les effets d'un traitement de CS n'ont été observés qu'à court terme, soit les trois premières journées suivant le choc initial du sepsis. Il est possible que ces effets puissent être différents sur une plus longue période de temps. De surcroît, la faible dose du traitement de CS assignée (soit 300 mg d'hydrocortisone) *in vitro* et *in vivo* est basée selon le traitement de support normalement octroyé aux patients septiques, mais ne peut toutefois pas convenir aux besoins de chaque individu. L'hydrocortisone est fréquemment utilisée en faibles doses chez les patients septiques dépendants des catécholamines pour ses effets glucocorticoïdes à durée d'action courte (<12h), c'est-à-dire ses propriétés anti-inflammatoires, avec une action minéralocorticoïde faible. Cette dernière doit être plus faible afin d'éviter des effets indésirables comme la rétention hydrosodée et l'hypokaliémie. Il serait intéressant d'approfondir nos connaissances sur les effets de différentes doses de plusieurs types de CS sur les fonctions des PMN au cours d'une plus longue période de temps. De plus, cette étude n'a pas tenu compte des patients septiques atteints d'insuffisance rénale, puisqu'il est difficile de le diagnostiquer avec certitude (Rossi *et al.*, 2009). La cortisolémie totale ne reflète pas systématiquement le cortisol libre et un taux élevé de cortisol peut être la conséquence d'un défaut d'élimination ou de résistance périphérique. Les dosages

hormonaux statiques ne permettent donc pas de confirmer un diagnostic d'insuffisance rénale dont les symptômes sont non spécifiques. Selon une étude menée par Annane *et al.*, regroupant des patients septiques dont le diagnostic d'insuffisance surrénale ne pouvait pas être exclu, la combinaison de CS, soient l'hydrocortisone pour ses effets anti-inflammatoires et la fludrocortisone pour ses effets minéralocorticoïdes (comme l'augmentation de la rétention hydrosodée), améliorait la survie des patients (Annane *et al.*, 2002). Dans la présente étude, l'usage d'un traitement de faibles doses de CS pourrait donc avoir des effets à court et moyen terme sur le pronostic des patients atteint de sepsis sévères et de choc septique, mais qui toutefois n'améliore pas de manière évidente le devenir des PMN chez les patients.

Niveaux élevés de PTX3 et IL-1RA plasmatiques dans le sepsis

Chez des sujets sains, il est démontré que de faibles concentrations de PTX3 (2 ng/ml) dans la circulation sanguine peuvent rapidement augmenter suite à un état inflammatoire et une infection (Uusitalo-Seppälä *et al.*, 2013). Un débalancement du profil plasmatique des cytokines pro- et anti-inflammatoires a été rapidement observé chez les patients septiques. Des concentrations élevées de PTX3 et IL1-RA ont été noté chez les deux groupes de patients et avaient tendance à diminuer jusqu'à des valeurs normales après 3 jours, mais n'étaient toutefois pas associées à la mortalité des patients. Dans le même sens que l'étude d'Uusitalo-Seppälä *et al.*, ceux-ci démontrent que les niveaux de PTX3 sont associés avec la progression du sepsis (Uusitalo-Seppälä *et al.*, 2013). Les niveaux élevés plasmatiques d'IL1-RA sont également associés à la sévérité du sepsis ainsi qu'à la survie des patients, comme il a été observé dans cette étude (Arnalich *et al.*, 1999). Les niveaux de ces deux cytokines ont cependant tendance à diminuer au cours des trois premières journées, ce qui suggère qu'ils sont sensibles à la progression de la maladie. Ces molécules pro- et anti-inflammatoires, facilement mesurables dans le plasma, peuvent être des marqueurs précoces du sepsis et fournir des indices au niveau de la sévérité de la maladie. Ils pourraient être ciblés pour de futures recherches et éventuellement comme des cibles thérapeutiques.

Limitations et perspectives

Au niveau technique, les manipulations étaient restreintes à la même journée étant donné que les PMN ont une durée de vie courte. Dans le même ordre d'idée, le temps d'incubation des PMN avec les CS était limité en raison du grand nombre de tests subséquents à faire. De plus, la sensibilité des PMN aurait pu créer un certain biais, étant donné que ce sont des cellules facilement activables *ex vivo* malgré plusieurs précautions (manipulation des PMN, matériel en contact avec ceux-ci). Quant au devis de l'étude, la fenêtre d'heure d'admission à J1 aux soins intensifs inférieure à 36 h, a restreint le recrutement des patients, en raison d'obligations techniques et organisationnelles. Les nombreux tests subséquents limitaient le prélèvement d'échantillons des patients en matinée. Cela pouvait donc mener à la comparaison de différents stades du sepsis à l'intérieur d'un même groupe. De plus, les patients atteints de cancer, de maladies cardiovasculaires ou de sepsis incertain étaient exclus de cette étude. Il était également difficile d'obtenir un prélèvement des patients à la troisième journée suivant leur admission, puisque la durée de leur séjour aux UFC était habituellement courte ou en raison de problèmes techniques (soit le patient était transféré hors des soins intensifs ou que la canule ait été retirée). Deux variables différenciaient le groupe de patients ayant un choc septique réfractaire du groupe de patients en choc septique contrôlé, de sorte que certaines associations ne peuvent pas être établies dans le cas de plusieurs observations fonctionnelles et phénotypiques. Toutefois, le nombre de patients recrutés qui est relativement faible est compensé par de multiples variables. Enfin, une meilleure compréhension des mécanismes d'action des CS non seulement sur les PMN mais aussi sur les autres cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, monocytes et lymphocytes) permettrait de mieux cibler leur utilisation, dans le but d'atteindre un meilleur rapport bénéfice/risque des CS dans le contexte d'une réaction inflammatoire systémique non contrôlée comme le choc septique. Il serait également intéressant d'investiguer les effets de différentes doses de CS, ainsi que la période d'exposition *in vitro*, car la dose et le temps assignés pourrait ne pas convenir aux besoins individuels des patients. De plus, comme cette étude n'a tenu compte que des trois premiers jours de sepsis, les CS pourraient avoir des effets au-delà de cette période, puisqu'un effet de rebond inflammatoire est possible suite à la phase aigüe du sepsis.

Conclusions

En conclusion, cette étude met en évidence un profond bouleversement des fonctions des PMN et de leur profil phénotypique au cours des phases précoces du sepsis sévère et du choc septique, qu'il soit réfractaire ou non. Plus précisément, ces stades sévères de sepsis atténuent l'activité phagocytaire, ainsi que la production de ROS, alors qu'ils amplifient leur adhésion et l'expression de certains marqueurs. Observée chez la majeure partie des patients, cette "paralysie immune" n'augmente pas seulement avec la sévérité du sepsis, mais persiste également jusqu'à trois jours suivant l'admission aux soins intensifs.

Par ailleurs, l'administration *in vitro* ou *in vivo* de faibles doses de CS influence les PMN de patients atteints de sepsis sévère et de choc septique réfractaire, mais n'a pas d'effet déterminant sur leurs fonctions et leur profil phénotypique au cours des 3 premières journées suivant leur admission. Plus précisément, les CS entretiennent l'allongement de la survie des PMN sans améliorer significativement les fonctions de ceux-ci (chimiotactisme, adhésion, phagocytose et dégranulation). De plus, le profil phénotypique des PMN n'a pas été affecté par un traitement aux CS (CD91 et HO-1). Ce traitement pourrait avoir un effet modulateur sur d'autres altérations fonctionnelles et phénotypiques, mais toutefois incertain au niveau du pronostic. Par ailleurs, cette étude n'a tenu compte que du comportement des PMN lors de la phase aiguë du sepsis et de l'effet d'une seule dose assignée de CS. Une investigation plus approfondie de l'effet de différentes doses de CS sur les autres types de cellules immunitaires et les interactions de ceux-ci avec les PMN dans un contexte de sepsis, serait nécessaire afin de mieux comprendre les facteurs intrinsèques à l'origine du dysfonctionnement des PMN chez les patients septiques. De plus, l'étude de l'impact des CS dans un contexte inflammatoire sévère tel que le choc septique, pourrait éventuellement être applicable à d'autres maladies inflammatoires systémiques non contrôlées comme la MPOC, la fibrose kystique et l'arthrite rhumatoïde.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail. J'adresse mes sincères remerciements à mes directeurs de recherche, les docteurs Olivier Lesur et Tamàs Fülöp, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire, guidé dans ce travail de longue haleine et avoir fait preuve d'une grande disponibilité. Non seulement ils m'ont fourni tous les outils nécessaires à mon cheminement scolaire, mais également leur soutien dans mes démarches personnelles sur le marché du travail.

Je voudrais également remercier les docteurs Yannick Poulin et François Lamontagne, le personnel infirmier des soins intensifs, ainsi que les infirmières de recherche Odette Baril et Éliette Théberge, pour leur participation au recrutement des patients et des témoins de ce projet et à la collection des échantillons.

Je remercie aussi le docteur Martin Richter, ainsi qu'Isabelle Marois et Dominic Cliché de leur aide et l'utilisation de leur cytomètre en flux FACSCanto.

Un énorme merci à Ginette Bilodeau non seulement pour son aide technique dès le début de ma maîtrise, mais aussi pour son soutien exceptionnel tout au long de mes années d'étude.

Enfin, un grand merci à tous mes collègues de travail, Aurélie Lepage, Sarra Baehl, Karine Bourgade, Frédéric Chagnon, Souade Ikhlef et Paméla Camponova, pour leur aide de près comme de loin au cours de mes expériences et qui ont bien voulu répondre à mes nombreuses questions. Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour Alexandra Bourguin, pour sa bonne humeur et ses encouragements.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Adrie, C., Azoulay, E., Francois, A., Clec'h, C., Darques, L., Schwebel, C., Nakache, D., Jamali, S., Goldgran-Toledano, D., Garrouste-Orgeas, M., & Timsit, J. F. (2007). Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal. *Chest*, *132*(6), 1786–93.
- Akerley, W. L., Guyre, P. M., & Davis, B. H. (1991). Neutrophil activation through high-affinity Fc gamma receptor using a monomeric antibody with unique properties. *Blood*, *77*(3), 607–15.
- Alba-Loureiro, T. C., Munhoz, C. D., Martins, J. O., Cerchiaro, G. A., Scavone, C., Curi, R., & Sannomiya, P. (2007). Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, *40*(8), 1037–44.
- Alves-Filho, J. C., de Freitas, A., Russo, M., & Cunha, F. Q. (2006). Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Critical care medicine*, *34*(2), 461–70.
- Alves-Filho, J. C., de Freitas, A., Spiller, F., Souto, F. O., & Cunha, F. Q. (2008). The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, *30 Suppl 1*, 3–9.
- Alves-Filho, J. C., Freitas, A., Souto, F. O., Spiller, F., Paula-Neto, H., Silva, J. S., Gazzinelli, R. T., Teixeira, M. M., Ferreira, S. H., & Cunha, F. Q. (2009). Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(10), 4018–23.
- Alves-Filho, J. C., Sônego, F., Souto, F. O., Freitas, A., Verri, W. A., Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., McKenzie, A. N., Xu, D., Cunha, F. Q., & Liew, F. Y. (2010). Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nature medicine*, *16*(6), 708–12.
- Alves-Filho, J. C., Spiller, F., & Cunha, F. Q. (2010). Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, *34 Suppl 1*, 15–21.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology*, *30*, 459–89.
- Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., & Pinsky, M. R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*, *29*(7), 1303–1310.

- Annane, D., Bellissant, E., Bollaert, P.-E., Briegel, J., Confalonieri, M., De Gaudio, R., Keh, D., Kupfer, Y., Oppert, M., & Meduri, G. U. (2009). Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA*, *301*(22), 2362–75.
- Annane, D., Sébille, V., Charpentier, C., Bollaert, P.-E., François, B., Korach, J.-M., Capellier, G., Cohen, Y., Azoulay, E., Troché, G., Chaumet-Riffaut, P., Chaumet-Riffaut, P., & Bellissant, E. (2002). Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*, *288*(7), 862–71.
- Arens, C., Bajwa, S. A., Koch, C., Siegler, B. H., Schneck, E., Hecker, A., Weiterer, S., Lichtenstern, C., Weigand, M. A., & Uhle, F. (2016). Sepsis-induced long-term immune paralysis - results of a descriptive, explorative study. *Critical care (London, England)*, *20*(1), 93.
- Arnalich, F., López, J., Codoceo, R., Jim nez, M., Madero, R., & Montiel, C. (1999). Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survival in sepsis and septic shock. *The Journal of infectious diseases*, *180*(3), 908–11.
- Arraes, S. M. A., Freitas, M. S., da Silva, S. V, de Paula Neto, H. A., Alves-Filho, J. C., Auxiliadora Martins, M., Basile-Filho, A., Tavares-Murta, B. M., Barja-Fidalgo, C., & Cunha, F. Q. (2006). Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood*, *108*(9), 2906–13.
- Bastrup-Birk, S., Skjoedt, M.-O., Munthe-Fog, L., Strom, J. J., Ma, Y. J., & Garred, P. (2013). Pentraxin-3 serum levels are associated with disease severity and mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome. *PloS one*, *8*(9), e73119.
- Basu, S., Hodgson, G., Katz, M., & Dunn, A. R. (2002). Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood*, *100*(3), 854–61.
- Becker, K. L., Snider, R., & Nysten, E. S. (2008). Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Critical care medicine*, *36*(3), 941–52.
- Békési, G., Kakucs, R., Várbiro, S., Rác, K., Sprintz, D., Fehér, J., & Székács, B. (2000). In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids*, *65*(12), 889–94.
- Belvisi, M. G. (2004). Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *1*(3), 207–14.
- Binet, F., Chiasson, S., & Girard, D. (2010). Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications*, *391*(1), 18–23.

- Bjornson, B. H., Harvey, J. M., & Rose, L. (1985). Differential effect of hydrocortisone on eosinophil and neutrophil proliferation. *The Journal of clinical investigation*, 76(3), 924–9.
- Bollaert, P. E., Charpentier, C., Levy, B., Debouverie, M., Audibert, G., & Larcan, A. (1998). Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone. *Critical care medicine*, 26(4), 645–50.
- Bonacina, F., Baragetti, A., Catapano, A. L., & Norata, G. D. (2013). Long pentraxin 3: experimental and clinical relevance in cardiovascular diseases. *Mediators of inflammation*, 2013, 725102.
- Bone, R. C. (1996a). Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Annals of internal medicine*, 125(8), 680–7.
- Bone, R. C. (1996b). Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Critical care medicine*, 24(7), 1125–8.
- Bone, R. C. (1996c). Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Critical care medicine*, 24(1), 163–72.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101(6), 1644–55.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657–70.
- Boss, B., Neeck, G., Engelhardt, B., & Riedel, W. (1999). Influence of corticosteroids on neutrophils, lymphocytes, their subsets, and T-cell activity markers in patients with active rheumatoid arthritis, compared to healthy controls. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876, 198–200.
- Boulangier, C. M., Amabile, N., & Tedgui, A. (2006). Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*, 48(2), 180–6.
- Boyer, A., Chadda, K., Salah, A., & Annane, D. (2006). Glucocorticoid treatment in patients with septic shock: effects on vasopressor use and mortality. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 44(7), 309–18.
- Briegel, J., Forst, H., Haller, M., Schelling, G., Kilger, E., Kuprat, G., Hemmer, B., Hummel, T., Lenhart, A., Heyduck, M., Stoll, C., & Peter, K. (1999). Stress doses of

hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study. *Critical care medicine*, 27(4), 723–32.

Brown, K. A., Brain, S. D., Pearson, J. D., Edgeworth, J. D., Lewis, S. M., & Treacher, D. F. (2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*, 368(9530), 157–69.

Calandra, T., Baumgartner, J. D., Grau, G. E., Wu, M. M., Lambert, P. H., Schellekens, J., Verhoef, J., & Glauser, M. P. (1990). Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *The Journal of infectious diseases*, 161(5), 982–7.

Cassatella, M. A. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology today*, 16(1), 21–6.

Cavaillon, J. M., Adib-Conquy, M., Cloëz-Tayarani, I., & Fitting, C. (2001). Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *Journal of endotoxin research*, 7(2), 85–93.

Chishti, A. D., Shenton, B. K., Kirby, J. A., & Baudouin, S. V. (2004). Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive care medicine*, 30(4), 605–11.

Christopher, M. J., & Link, D. C. (2007). Regulation of neutrophil homeostasis. *Current opinion in hematology*, 14(1), 3–8.

Chung, L. P., & Waterer, G. W. (2011). Genetic predisposition to respiratory infection and sepsis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(5-6), 250–68.

Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420(6917), 885–91.

Combes, A., Luyt, C.-E., Trouillet, J.-L., Nieszkowska, A., & Chastre, J. (2009). Gender impact on the outcomes of critically ill patients with nosocomial infections. *Critical care medicine*, 37(9), 2506–11.

Cox, G. (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(9), 4719–25.

Crockard, A. D., Boylan, M. T., Droogan, A. G., McMillan, S. A., & Hawkins, S. A. (1998). Methylprednisolone-induced neutrophil leukocytosis--down-modulation of neutrophil L-selectin and Mac-1 expression and induction of granulocyte-colony stimulating factor. *International journal of clinical & laboratory research*, 28(2), 110–5.

- Cronin, L., Cook, D. J., Carlet, J., Heyland, D. K., King, D., Lansang, M. A., & Fisher, C. J. (1995). Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Critical care medicine*, 23(8), 1430–9.
- Cummings, C. J., Martin, T. R., Frevert, C. W., Quan, J. M., Wong, V. A., Mongovin, S. M., Hagen, T. R., Steinberg, K. P., & Goodman, R. B. (1999). Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(4), 2341–6.
- Danai, P. A. (2006). The Epidemiology of Sepsis in Patients With Malignancy<xref rid="AFF1">*. *CHEST Journal*, 129(6), 1432.
- Danikas, D. D., Karakantza, M., Theodorou, G. L., Sakellaropoulos, G. C., & Gogos, C. A. (2008). Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clinical and experimental immunology*, 154(1), 87–97.
- De Backer, D., Creteur, J., Preiser, J.-C., Dubois, M.-J., & Vincent, J.-L. (2002). Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166(1), 98–104.
- De Kruif, M. D., Lemaire, L. C., Giebelen, I. A., van Zoelen, M. A. D., Pater, J. M., van den Pangaart, P. S., Groot, A. P., de Vos, A. F., Elliott, P. J., Meijers, J. C. M., Levi, M., & van der Poll, T. (2007). Prednisolone dose-dependently influences inflammation and coagulation during human endotoxemia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(3), 1845–51.
- De Pablo, R., Monserrat, J., Reyes, E., Diaz-Martin, D., Rodriguez Zapata, M., Carballo, F., de la Hera, A., Prieto, A., & Alvarez-Mon, M. Mortality in patients with septic shock correlates with anti-inflammatory but not proinflammatory immunomodulatory molecules. *Journal of intensive care medicine*, 26(2), 125–32.
- Deans, K. J., Haley, M., Natanson, C., Eichacker, P. Q., & Minneci, P. C. (2005). Novel therapies for sepsis: a review. *The Journal of trauma*, 58(4), 867–874.
- Deban, L., Russo, R. C., Sironi, M., Moalli, F., Scanziani, M., Zambelli, V., Cuccovillo, I., Bastone, A., Gobbi, M., Valentino, S., Doni, A., Garlanda, C., Danese, S., Salvatori, G., Sassano, M., Evangelista, V., Rossi, B., Zenaro, E., Constantin, G., Laudanna, C., Bottazzi, B., & Mantovani, A. (2010). Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nature immunology*, 11(4), 328–34.
- Delano, M. J., Kelly-Scumpia, K. M., Thayer, T. C., Winfield, R. D., Scumpia, P. O., Cuenca, A. G., Harrington, P. B., O'Malley, K. A., Warner, E., Gabrilovich, S., Mathews, C. E., Laface, D., Heyworth, P. G., Ramphal, R., Strieter, R. M., Moldawer, L. L., & Efron, P. A. (2011). Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is

dependent on CXCL12 signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(2), 911–8.

Dellinger, R. P., Levy, M. M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S. M., Sevransky, J. E., Sprung, C. L., Douglas, I. S., Jaeschke, R., Osborn, T. M., Nunnally, M. E., Townsend, S. R., Reinhart, K., Kleinpell, R. M., Angus, D. C., Deutschman, C. S., Machado, F. R., Rubenfeld, G. D., Webb, S., Beale, R. J., Vincent, J.-L., & Moreno, R. (2013). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive care medicine*, 39(2), 165–228.

Demaret, J., Venet, F., Friggeri, A., Cazalis, M.-A., Plassais, J., Jallades, L., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Textoris, J., Lepape, A., & Monneret, G. (2015). Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *Journal of leukocyte biology*.

Derouet, M., Thomas, L., Moulding, D. A., Akgul, C., Cross, A., Moots, R. J., & Edwards, S. W. (2006). Sodium salicylate promotes neutrophil apoptosis by stimulating caspase-dependent turnover of Mcl-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(2), 957–65.

Dimoula, A., Pradier, O., Kassengera, Z., Dalcomune, D., Turkan, H., & Vincent, J.-L. (2014). Serial determinations of neutrophil CD64 expression for the diagnosis and monitoring of sepsis in critically ill patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58(6), 820–9.

Doni, A., Mantovani, G., Porta, C., Tuckermann, J., Reichardt, H. M., Kleiman, A., Sironi, M., Rubino, L., Pasqualini, F., Nebuloni, M., Signorini, S., Peri, G., Sica, A., Beck-Peccoz, P., Bottazzi, B., & Mantovani, A. (2008). Cell-specific regulation of PTX3 by glucocorticoid hormones in hematopoietic and nonhematopoietic cells. *The Journal of biological chemistry*, 283(44), 29983–92.

Ducker, T. P., & Skubitz, K. M. (1992). Subcellular localization of CD66, CD67, and NCA in human neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 52(1), 11–6.

Edwards, S. W. (2005). The development and structure of mature neutrophils. In *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil* (SW Edwards.). New York: Cambridge Univ. Press, pp. 33–76.

Esper, A. M., Moss, M., Lewis, C. A., Nisbet, R., Mannino, D. M., & Martin, G. S. (2006). The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Critical care medicine*, 34(10), 2576–82.

Fadok, V. A., McDonald, P. P., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1998). Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochemical Society transactions*, 26(4), 653–6.

- Fernandez Falcon, M. F., Echague, C. G., Hair, P. S., Nyalwidhe, J. O., & Cunnion, K. M. (2011). Protease inhibitors decrease IgG shedding from *Staphylococcus aureus*, increasing complement activation and phagocytosis efficiency. *Journal of medical microbiology*, *60*(Pt 10), 1415–22.
- Ferrer, R., Artigas, A., Suarez, D., Palencia, E., Levy, M. M., Arenzana, A., Pérez, X. L., & Sirvent, J.-M. (2009). Effectiveness of Treatments for Severe Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *180*(9), 861–866.
- Feuk-Lagerstedt, E., Jordan, E. T., Leffler, H., Dahlgren, C., & Karlsson, A. (1999). Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *163*(10), 5592–8.
- Fialkow, L., Fochesatto Filho, L., Bozzetti, M. C., Milani, A. R., Rodrigues Filho, E. M., Ladniuk, R. M., Pierozan, P., de Moura, R. M., Prolla, J. C., Vachon, E., & Downey, G. P. (2006). Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Critical care (London, England)*, *10*(6), R155.
- Fortin, C. F., McDonald, P. P., Lesur, O., & Fülöp, T. (2008). Aging and neutrophils: there is still much to do. *Rejuvenation research*, *11*(5), 873–82.
- Fourrier, F., Chopin, C., Goudemand, J., Hendrycx, S., Caron, C., Rime, A., Marey, A., & Lestavel, P. (1992). Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest*, *101*(3), 816–23.
- Franks, Z., Carlisle, M., & Rondina, M. T. (2015). Current challenges in understanding immune cell functions during septic syndromes. *BMC immunology*, *16*(1), 11.
- Freitas, A., Alves-Filho, J. C., Secco, D. D., Neto, A. F., Ferreira, S. H., Barja-Fidalgo, C., & Cunha, F. Q. (2006). Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *British journal of pharmacology*, *149*(4), 345–54.
- Frumento, G., Bonvini, E., Minervini, F., Dallegri, F., Patrone, F., & Sacchetti, C. (1984). Defective neutrophil mobilization to skin chambers in cancer patients. *Journal of cancer research and clinical oncology*, *107*(1), 53–6.
- Futosi, K., Fodor, S., & Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International immunopharmacology*, *17*(3), 638–50.
- Gainet, J., Chollet-Martin, S., Brion, M., Hakim, J., Gougerot-Pocidallo, M. A., & Elbim, C. (1998). Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *78*(6), 755–62.

Gallo-Payet, N. (2016). Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH. *Journal of molecular endocrinology*.

Gattas, D. J., & Cook, D. J. (2003). Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis: health technology assessment in the ICU. *Journal of critical care*, 18(1), 52–8.

Gogos, C., Kotsaki, A., Pelekanou, A., Giannikopoulos, G., Vaki, I., Maravitsa, P., Adamis, S., Alexiou, Z., Andrianopoulos, G., Antonopoulou, A., Athanassia, S., Baziaka, F., Charalambous, A., Christodoulou, S., Dimopoulou, I., Floros, I., Giannitsioti, E., Gkanas, P., Ioakeimidou, A., Kanellakopoulou, K., Karabela, N., Karagianni, V., Katsarolis, I., Kontopithari, G., Kopterides, P., Koutelidakis, I., Koutoukas, P., Kranidioti, H., Lignos, M., Louis, K., Lymberopoulou, K., Mainas, E., Marioli, A., Massouras, C., Mavrou, I., Mpalla, M., Michalia, M., Mylona, H., Mytas, V., Papanikolaou, I., Papanikolaou, K., Patrani, M., Perdios, I., Plachouras, D., Pistiki, A., Protopapas, K., Rigaki, K., Sakka, V., Sartzi, M., Skouras, V., Souli, M., Spyridaki, A., Strouvalis, I., Tsaganos, T., Zografos, G., Mandragos, K., Klouva-Molyvdas, P., Maggina, N., Giamarellou, H., Armaganidis, A., & Giamarellos-Bourboulis, E. J. (2010). Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. *Critical care (London, England)*, 14(3), R96.

Gougerot-Pocidallo, M. A., el Benna, J., Elbim, C., Chollet-Martin, S., & Dang, M. C. (2002). [Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines]. *Journal de la Société de biologie*, 196(1), 37–46.

Gupta, P., & Bhatia, V. (2008). Corticosteroid physiology and principles of therapy. *The Indian Journal of Pediatrics*, 75(10), 1039–1044.

Hamza, B., Wong, E., Patel, S., Cho, H., Martel, J., & Irimia, D. (2014). Retrotaxis of human neutrophils during mechanical confinement inside microfluidic channels. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 6(2), 175–83.

Heasman, S. J., Giles, K. M., Ward, C., Rossi, A. G., Haslett, C., & Dransfield, I. (2003). Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *The Journal of endocrinology*, 178(1), 29–36.

Hirsh, M., Mahamid, E., Bashenko, Y., Hirsh, I., & Krausz, M. M. (2001). Overexpression of the high-affinity Fcγ receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 16(2), 102–8.

Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75(2), 241–51.

Hollenberg, S. M., & Cunnion, R. E. (1994). Endothelial and vascular smooth muscle function in sepsis. *Journal of critical care*, 9(4), 262–80.

- Hoogerwerf, J. J., Tanck, M. W. T., van Zoelen, M. A. D., Wittebole, X., Laterre, P.-F., & van der Poll, T. (2010). Soluble ST2 plasma concentrations predict mortality in severe sepsis. *Intensive care medicine*, *36*(4), 630–7.
- Hotchkiss, R. S., Coopersmith, C. M., McDunn, J. E., & Ferguson, T. A. (2009). The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nature medicine*, *15*(5), 496–7.
- Iskander, K. N., Osuchowski, M. F., Stearns-Kurosawa, D. J., Kurosawa, S., Stepien, D., Valentine, C., & Remick, D. G. (2013). *Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding*. *Physiological reviews*.
- Jankowski, A., Scott, C. C., & Grinstein, S. (2002). Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *The Journal of biological chemistry*, *277*(8), 6059–66.
- Janz, D. R., Bastarache, J. a, Sills, G., Wickersham, N., May, A. K., Bernard, G. R., & Ware, L. B. (2013). Association between haptoglobin, hemopexin and mortality in adults with sepsis. *Critical care (London, England)*, *17*, R272.
- Jawa, R. S., Anillo, S., Huntoon, K., Baumann, H., & Kulaylat, M. Analytic review: Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care: part I: basic science. *Journal of intensive care medicine*, *26*(1), 3–12.
- Johnston, B., Burns, A. R., Suematsu, M., *et al.* (1999). Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *The Journal of clinical investigation*, *103*(9), 1269–76.
- Kapoor, A., & Thiemermann, C. (2011). Targeting CCR2: a novel therapeutic strategy for septic shock? *American journal of respiratory and critical care medicine*, *183*(2), 150–1.
- Kaufmann, I., Briegel, J., Schliephake, F., *et al.* (2008). Stress doses of hydrocortisone in septic shock: beneficial effects on opsonization-dependent neutrophil functions. *Intensive care medicine*, *34*(2), 344–9.
- Kaufmann, I., Hoelzl, A., Schliephake, F., *et al.* (2006). Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. *Shock (Augusta, Ga.)*, *26*(3), 254–261.
- Keh, D., Boehnke, T., Weber-Cartens, S., *et al.* (2003). Immunologic and hemodynamic effects of “low-dose” hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *167*(4), 512–20.
- Kennedy, A. D., & DeLeo, F. R. (2009). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic research*, *43*(1-3), 25–61.

- Kerst, J. M., van de Winkel, J. G., Evans, A. H., *et al.* (1993). Granulocyte colony-stimulating factor induces hFc gamma RI (CD64 antigen)-positive neutrophils via an effect on myeloid precursor cells. *Blood*, *81*(6), 1457–64.
- Khakpour, S., Wilhelmsen, K., & Hellman, J. (2015). Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate immunity*, *21*(8), 827–46.
- Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., *et al.* (1985). APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical care medicine*, *13*(10), 818–29.
- Knaus, W. A., Sun, X., Nystrom, O., *et al.* (1992). Evaluation of definitions for sepsis. *Chest*, *101*(6), 1656–62.
- Knight, J. S., Carmona-Rivera, C., & Kaplan, M. J. (2012). Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, *3*, 380.
- Köffel, R., Meshcheryakova, A., Warszawska, J., *et al.* (2014). Monocytic cell differentiation from band-stage neutrophils under inflammatory conditions via MKK6 activation. *Blood*, *124*(17), 2713–24.
- Kovach, M. A., & Standiford, T. J. (2012). The function of neutrophils in sepsis. *Current opinion in infectious diseases*, *25*(3), 321–7.
- Kuijpers, T. W., Hoogerwerf, M., van der Laan, L. J., *et al.* (1992). CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *The Journal of cell biology*, *118*(2), 457–66.
- Kuwabara, I., & Liu, F. T. (1996). Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *156*(10), 3939–44.
- Landry, D. W., Levin, H. R., Gallant, E. M., *et al.* (1997). Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation*, *95*(5), 1122–5.
- Larsen, R., Gozzelino, R., Jeney, V., *et al.* (2010). A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Science translational medicine*, *2*(51), 51ra71.
- Le, H. T., Tran, V. G., Kim, W., *et al.* (2012). IL-33 priming regulates multiple steps of the neutrophil-mediated anti-*Candida albicans* response by modulating TLR and dectin-1 signals. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *189*(1), 287–95.
- Lekkou, A., Mouzaki, A., Siagris, D., *et al.* (2014). Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis. *Journal of critical care*, *29*(5), 723–7.

- Lesur, O, Bériault, M.-J., & Mayette, M. (2012). Fluid Resuscitation in Sepsis: A Quality of Care Study on Practices in the Early Management of Septic Shock. *Journal of Emergency & Disaster Medicine*.
- Lesur, O., Kokis, A., Hermans, C., *et al.* (2000). Interleukin-2 involvement in early acute respiratory distress syndrome: relationship with polymorphonuclear neutrophil apoptosis and patient survival. *Critical care medicine*, 28(12), 3814–22.
- Levi, M., & van der Poll, T. (2010). Inflammation and coagulation. *Critical care medicine*, 38(2 Suppl), S26–34.
- Levine, P. H., Hardin, J. C., Scoon, K. L., *et al.* (1981). Effect of corticosteroids on the production of superoxide and hydrogen peroxide and the appearance of chemiluminescence by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation*, 5(1), 19–27.
- Levy, B. D., Clish, C. B., Schmidt, B., *et al.* (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature immunology*, 2(7), 612–9.
- Levy, M. M., Artigas, A., Phillips, G. S., *et al.* (2012). Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *The Lancet. Infectious diseases*, 12(12), 919–24.
- Ley, K. (2002). Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunological reviews*, 186, 8–18.
- Liang, X., Lin, T., Sun, G., *et al.* (2009). Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 86(2), 229–35.
- Liles, W. C., Dale, D. C., & Klebanoff, S. J. (1995). Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood*, 86(8), 3181–8.
- Livaditi, O., Kotanidou, A., Psarra, A., *et al.* (2006). Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine*, 36(5-6), 283–90.
- Luan, Y., Yao, Y., Xiao, X., *et al.* (2015). Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 35(1), 17–22.
- Lv, S., Han, M., Yi, R., *et al.* (2014). Anti-TNF- α therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *International journal of clinical practice*, 68(4), 520–8.
- Macdonald, J., Galley, H. F., & Webster, N. R. (2003). Oxidative stress and gene expression in sepsis. *British journal of anaesthesia*, 90(2), 221–32.

- Mantovani, A., Cassatella, M. a, Costantini, C., *et al.* (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*, *11*(8), 519–531.
- Martin, C., Boisson, C., Haccoun, M., *et al.* (1997). Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. *Critical care medicine*, *25*(11), 1813–9.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., *et al.* (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine*, *348*, 1546–1554.
- Martins, P. S., Brunialti, M. K. C., Martos, L. S. W., *et al.* (2008). Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Critical care (London, England)*, *12*(1), R25.
- Martins, P. S., Kallas, E. G., Neto, M. C., *et al.* (2003). Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock (Augusta, Ga.)*, *20*(3), 208–12.
- Marwick, J. A., Dorward, D. A., Lucas, C. D., *et al.* (2013). Oxygen levels determine the ability of glucocorticoids to influence neutrophil survival in inflammatory environments. *Journal of leukocyte biology*, *94*(6), 1285–92.
- Mastroianni, C. M., Lichtner, M., Mengoni, F., *et al.* (1999). Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. *AIDS (London, England)*, *13*(8), 883–90.
- Mathias, J. R., Perrin, B. J., Liu, T.-X., *et al.* (2006). Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *Journal of leukocyte biology*, *80*(6), 1281–8.
- Matsumoto, H., Yamakawa, K., Ogura, H., *et al.* (2015). Enhanced expression of cell-specific surface antigens on endothelial microparticles in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Shock (Augusta, Ga.)*, *43*(5), 443–9.
- Matsushima, H., Geng, S., Lu, R., *et al.* (2013). Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*, *121*(10), 1677–89.
- Maugeri, N., Cerletti, C., Donati, M. B., *et al.* (2006). Neutrophils and sepsis. *Lancet (London, England)*, *368*(9542), 1153.
- Mauri, T., Bellani, G., Patroniti, N., *et al.* (2010). Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality. *Intensive care medicine*, *36*(4), 621–9.

- Mayadas, T. N., & Cullere, X. (2005). Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends in immunology*, 26(7), 388–95.
- Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. a. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annual review of pathology*, 9(September 2013), 181–218.
- Mayr, F. B., Yende, S., Linde-Zwirble, W. T., *et al.* (2010). Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA*, 303(24), 2495–503.
- McEver, R. P. (2010). Rolling back neutrophil adhesion. *Nature immunology*, 11(4), 282–4.
- McGee, S., & Hirschmann, J. (2008). Use of corticosteroids in treating infectious diseases. *Archives of internal medicine*, 168(10), 1034–46.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 1(2), 135–45.
- Mica, L., Härter, L., Trentz, O., *et al.* (2004). Endotoxin reduces CD95-induced neutrophil apoptosis by cIAP-2-mediated caspase-3 degradation. *Journal of the American College of Surgeons*, 199(4), 595–602.
- Milot, E., Fotouhi-Ardakani, N., & Filep, J. G. (2012). Myeloid nuclear differentiation antigen, neutrophil apoptosis and sepsis. *Frontiers in immunology*, 3, 397.
- Minnecci, P. C., Deans, K. J., Banks, S. M., *et al.* (2004). Meta-analysis: the effect of steroids on survival and shock during sepsis depends on the dose. *Annals of internal medicine*, 141(1), 47–56.
- Mishra, M., Byrd, M. S., Sergeant, S., *et al.* (2012). Pseudomonas aeruginosa Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cellular microbiology*, 14(1), 95–106.
- Müller, B., Peri, G., Doni, A., *et al.* (2002). High circulating levels of the IL-1 type II decoy receptor in critically ill patients with sepsis: association of high decoy receptor levels with glucocorticoid administration. *Journal of leukocyte biology*, 72(4), 643–9.
- Muller Kobold, a C., Tulleken, J. E., Zijlstra, J. G., *et al.* (2000). Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive care medicine*, 26, 883–892.
- Muller Kobold, A. C., Tulleken, J. E., Zijlstra, J. G., *et al.* (2000). Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive care medicine*, 26(7), 883–92.

- Murphy, J. F., McGregor, J. L., & Leung, L. L. (1998). Senescent human neutrophil binding to thrombospondin (TSP): evidence for a TSP-independent pathway of phagocytosis by macrophages. *British journal of haematology*, *102*(4), 957–64.
- Nagel, G., & Grunert, F. (1995). From genes to proteins: the nonspecific cross-reacting antigens. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *16*(1), 17–22.
- Nakae, H., Endo, S., Inada, K., *et al.* (1996). Changes in adhesion molecule levels in sepsis. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*, *91*(3), 329–38.
- Nakagawa, M., Terashima, T., D'yachkova, Y., *et al.* (1998). Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. *Circulation*, *98*(21), 2307–13.
- Namath, A., & Patterson, A. J. (2011). Genetic Polymorphisms in Sepsis. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, *23*(1), 181–202.
- Nordenfelt, P., & Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, *90*(2), 271–84.
- Nussey, S., & Whitehead, S. (2001). *Endocrinology: An Integrated Approach - PubMed - NCBI* (BIOS Scien.). Oxford, Chapter 3.
- O'Neill, L. A. J. (2006). Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, *5*(7), 549–63.
- Oberholzer, A., Oberholzer, C., & Moldawer, L. L. (2001). Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock (Augusta, Ga.)*, *16*(2), 83–96.
- Oppert, M., Schindler, R., Husung, C., *et al.* (2005). Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock. *Critical care medicine*, *33*(11), 2457–64.
- Ostanin, A. A., Leplina, O. Y., Shevela, C. Y., *et al.* (2000). Inflammatory Syndromes (SIRS, MARS, CARS) in Patients with Surgical Infection. *Russian journal of immunology : RJI : official journal of Russian Society of Immunology*, *5*(3), 289–300.
- Osuchowski, M. F., Welch, K., Siddiqui, J., *et al.* (2006). Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *177*(3), 1967–74.
- Parham, P., Atanassov, C., & Masson, P. (2003). L'immunité anti-infectieuse. In *Le système immunitaire*. (1ere ed. P.). De Boeck, pp. 201–240.

- Parker, L. C., Whyte, M. K. B., Dower, S. K., *et al.* (2005). The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *Journal of leukocyte biology*, 77(6), 886–92.
- Paunel-Görgülü, A., Kirichevska, T., Lögters, T., *et al.* (2012). Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 18, 325–35.
- Pepys, M. B., & Hirschfield, G. M. (2003). C-reactive protein: a critical update. *The Journal of clinical investigation*, 111(12), 1805–12.
- Piagnerelli, M., Cotton, F., Van Nuffelen, M., *et al.* (2012). Modifications in erythrocyte membrane protein content are not responsible for the alterations in rheology seen in sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 37(1), 17–21.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., *et al.* (2010). In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116(4), 625–7.
- Preas, H. L., Nysten, E. S., Snider, R. H., *et al.* (2001). Effects of anti-inflammatory agents on serum levels of calcitonin precursors during human experimental endotoxemia. *The Journal of infectious diseases*, 184(3), 373–6.
- Reddy, R. C., Narala, V. R., Keshamouni, V. G., *et al.* (2008). Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Blood*, 112(10), 4250–8.
- Reddy, R. C., & Standiford, T. J. (2010). Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Current opinion in hematology*, 17(1), 18–24.
- Riché, F. C., Cholley, B. P., Panis, Y. H., *et al.* (2000). Inflammatory cytokine response in patients with septic shock secondary to generalized peritonitis. *Critical care medicine*, 28(2), 433–7.
- Rivers, E., Nguyen, B., Havstad, S., *et al.* (2001). Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 345(19), 1368–1377.
- Roger, T., & Calandra, T. (2010). Interleukin-33 safeguards neutrophils in sepsis. *Nature medicine*, 16(6), 638–9.
- Rossi, A., Illouz, S., & Annane, D. (2009). Faut-il toujours utiliser les corticoïdes dans le choc septique ? *Réanimation*, 18(4), 309–322.
- Rostan, O., Arshad, M. I., Piquet-Pellorce, C., *et al.* (2015). Crucial and diverse role of the interleukin-33/ST2 axis in infectious diseases. *Infection and immunity*, 83(5), 1738–48.

- Ruchaud-Sparagano, M. H., Stocks, S. C., Turley, H., *et al.* (1997). Activation of neutrophil function via CD66: differential effects upon beta 2 integrin mediated adhesion. *British journal of haematology*, 98(3), 612–20.
- Saito, H., Lai, J., Rogers, R., *et al.* (2002). Mechanical properties of rat bone marrow and circulating neutrophils and their responses to inflammatory mediators. *Blood*, 99(6), 2207–13.
- Santos, S. S., Brunialti, M. K. C., Rigato, O., *et al.* (2012). Generation of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Monocytes From Septic Patients and Association With Outcomes. *Shock*, 38(1), 18–23.
- Schmidt, T., Zündorf, J., Grüger, T., *et al.* (2012). CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *Journal of leukocyte biology*, 91(5), 791–802.
- Schröder, J., Kahlke, V., Book, M., *et al.* (2000). Gender differences in sepsis: genetically determined? *Shock (Augusta, Ga.)*, 14(3), 307–10; discussion 310–3.
- Segal, A. W., Dorling, J., & Coade, S. (1980). Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies. *The Journal of cell biology*, 85(1), 42–59.
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Dalli, J. (2015). The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in immunology*, 27(3), 200–15.
- Shao, B., Belaouaj, A., Verlinde, C. L. M. J., *et al.* (2005). Methionine sulfoxide and proteolytic cleavage contribute to the inactivation of cathepsin G by hypochlorous acid: an oxidative mechanism for regulation of serine proteinases by myeloperoxidase. *The Journal of biological chemistry*, 280(32), 29311–21.
- Sharawy, N. (2014). Vasoplegia in septic shock: do we really fight the right enemy? *Journal of critical care*, 29(1), 83–7.
- Sheppard, F. R., Kelher, M. R., Moore, E. E., *et al.* (2005). Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *Journal of leukocyte biology*, 78(5), 1025–42.
- Silva, S. C., Baggio-Zappia, G. L., Brunialti, M. K. C., *et al.* (2014). Evaluation of Toll-like, chemokine, and integrin receptors on monocytes and neutrophils from peripheral blood of septic patients and their correlation with clinical outcomes. *Brazilian journal of medical and biological research*, 47(5), 384–93.
- Skibsted, S., Jones, A. E., Puskarich, M. A., *et al.* (2013). Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 39(5), 427–32.

- Skoutelis, A. T., Kaleridis, V., Athanassiou, G. M., *et al.* (2000). Neutrophil deformability in patients with sepsis, septic shock, and adult respiratory distress syndrome. *Critical care medicine*, 28(7), 2355–9.
- Skubitz, K. M., Campbell, K. D., & Skubitz, A. P. (1996). CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 60(1), 106–17.
- Skubitz, K. M., & Hammerschmidt, D. E. (1986). Corticosteroids reversibly inhibit chemotactic peptide-receptor binding and granulocyte response, yet allow desensitization and receptor down-regulation. *Blood*, 68(4), 830–6.
- Snelgrove, R. J., Jackson, P. L., Hardison, M. T., *et al.* (2010). A critical role for LTA4H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), 90–4.
- Soehnlein, O., & Lindbom, L. (2009). Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system. *Journal of leukocyte biology*, 85(3), 344–51.
- Soehnlein, O., Weber, C., & Lindbom, L. (2009). Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends in immunology*, 30(11), 538–46.
- Souto, F. O., Alves-Filho, J. C., Turato, W. M., *et al.* (2011). Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(2), 234–42.
- Spiller, F., Costa, C., Souto, F. O., *et al.* (2011). Inhibition of neutrophil migration by hemopexin leads to increased mortality due to sepsis in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183, 922–931.
- Sprung, C. L., Goodman, S., & Weiss, Y. G. (2011). Steroid therapy of septic shock. *Critical care nursing clinics of North America*, 23(1), 171–80.
- Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., *et al.* (2011). The pathogenesis of sepsis. *Annual review of pathology*, 6, 19–48.
- Stuart, L. M., & Ezekowitz, R. A. B. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, 22(5), 539–50.
- Swain, S. D., Rohn, T. T., & Quinn, M. T. (2002). Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxidants & redox signaling*, 4(1), 69–83.
- Tak, T., Tesselaar, K., Pillay, J., *et al.* (2013). What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of leukocyte biology*, 94(4), 595–601.

- Takahashi, T., Shimizu, H., Akagi, R., *et al.* (2006). Heme oxygenase-1: a new drug target in oxidative tissue injuries in critically ill conditions. *Drug Development Research*, 67(2), 130–153.
- Takaki, S., Takeyama, N., Kajita, Y., *et al.* (2010). Beneficial effects of the heme oxygenase-1/carbon monoxide system in patients with severe sepsis/septic shock. *Intensive care medicine*, 36(1), 42–8.
- Tang, B. M. P., Eslick, G. D., Craig, J. C., *et al.* (2007). Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, 7(3), 210–7.
- Tauber, A. I., & Babior, B. M. (1977). Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 60(2), 374–9.
- Tavares-Murta, B. M., Zapparoli, M., Ferreira, R. B., *et al.* (2002). Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Critical care medicine*, 30(5), 1056–61.
- Tofts, P. S., Chevassut, T., Cutajar, M., *et al.* (2011). Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 117(22), 6050–2; author reply 6053–4.
- Tolosano, E., & Altruda, F. (2002). Hemopexin: Structure, Function, and Regulation. *DNA and Cell Biology*, 21(4), 297–306.
- Torsteinsdóttir, I., Arvidson, N. G., Hällgren, R., *et al.* (1999). Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scandinavian journal of immunology*, 50(4), 433–9.
- Tsalik, E. L., Jaggars, L. B., Glickman, S. W., *et al.* (2012). Discriminative value of inflammatory biomarkers for suspected sepsis. *The Journal of emergency medicine*, 43(1), 97–106.
- Uusitalo-Seppälä, R., Huttunen, R., Aittoniemi, J., *et al.* (2013). Pentraxin 3 (PTX3) is associated with severe sepsis and fatal disease in emergency room patients with suspected infection: a prospective cohort study. *PloS one*, 8(1), e53661.
- Varki, A., & Gagneux, P. (2012). Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253, 16–36.
- Vincent, J. J.-L., Rello, J., Marshall, J., *et al.* (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA: the journal of*, 302(21), 2323–2329.

- Vincent, J. L., Zhang, H., Szabo, C., *et al.* (2000). Effects of nitric oxide in septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(6), 1781–5.
- Wagenaar, J. F. P., Gasem, M. H., Goris, M. G. A., *et al.* (2009). Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe Leptospirosis. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(6), e453.
- Wang, X., Liu, C., & Wang, G. (2016). Propofol Protects Rats and Human Alveolar Epithelial Cells Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via Inhibiting HMGB1 Expression. *Inflammation*.
- Weighardt, H., & Holzmann, B. (2007). Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology*, 212(9-10), 715–22.
- Wenisch, C., & Graninger, W. (1995). Are soluble factors relevant for polymorphonuclear leukocyte dysregulation in septicemia? *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 2(2), 241–5.
- Wenisch, C., Parschalk, B., Patruta, S., *et al.* (1999). Effect of polyclonal immunoglobulins on neutrophil phagocytic capacity and reactive oxygen production in patients with gram-negative septicemia. *Infection*, 27(3), 183–186.
- Wesche, D. E., Lomas-Neira, J. L., Perl, M., *et al.* (2005). Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *Journal of leukocyte biology*, 78(2), 325–37.
- Wiersinga, W. J. (2011). Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. *Current opinion in critical care*, 17(5), 480–6.
- Wilson, M. E. Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. *Reviews of infectious diseases*, 7(3), 404–18.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., *et al.* (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(5), 617–53.
- Wittamer, V., Bondue, B., Guillaibert, A., *et al.* (2005). Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(1), 487–93.
- Zeni, F., Freeman, B., & Natanson, C. (1997). Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Critical care medicine*, 25(7), 1095–100.

ANNEXES

Publication :

- Le Page A, Bourgade K, **Lamoureux J**, Dupuis G, Fülöp T, Frost E, Pawelec G and Larbi A. (2015) Functional and Phenotypic Alterations in NK Cells in aMCI and Mild Alzheimer Patients. *J Alzheimers Dis.*, 46(1), 93-107.

Communication :

- Présentation d'affiche au congrès « International Symposium Neutrophils 2014 » à Montréal :

Lamoureux J, Fülöp T and Lesur O. *Neutrophil's behavior in severe and refractory human sepsis: impact of corticosteroids (in vivo and in vitro)*, International Symposium Neutrophil 2014, Montréal, Québec, Canada, Juin 2014, conférence internationale.