

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2011

THESE N°

INTERETS DIAGNOSTIQUE ET PRONOSTIQUE D'UN
IMMUNOPHENOTYPAGE LEUCOCYTAIRE ETENDU PAR CYTOMETRIE EN
FLUX A LA PHASE AIGUE DU SEPSIS : ETUDE SEPTIFLUX

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 Octobre 2011

Par :

Marie ORABONA

Née le 28 Juin 1981, à Saint Martin d'Hères (38)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur N. NATHAN-DENIZOT

Président

Monsieur le Professeur P. BEAULIEU

Juge

Monsieur le Professeur J. FEUILLARD

Juge

Monsieur le Professeur P. VIGNON

Juge

Monsieur le Docteur B. FRANCOIS

Membre invité

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**

ANNEE 2011

THESE N°

**INTERETS DIAGNOSTIQUE ET PRONOSTIQUE D'UN
IMMUNOPHENOTYPAGE LEUCOCYTAIRE ETENDU PAR CYTOMETRIE EN
FLUX A LA PHASE AIGUE DU SEPSIS : ETUDE SEPTIFLUX**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 Octobre 2011

Par :

Marie ORABONA

Née le 28 Juin 1981, à Saint Martin d'Hères (38)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur N. NATHAN-DENIZOT

Président

Monsieur le Professeur P. BEAULIEU

Juge

Monsieur le Professeur J. FEUILLARD

Juge

Monsieur le Professeur P. VIGNON

Juge

Monsieur le Docteur B. FRANCOIS

Membre invité

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur Denis VALLEIX

ASSESEURS :

Monsieur le Professeur Marc LASKAR
Monsieur le Professeur Jean-Jacques MOREAU
Monsieur le Professeur Pierre-Marie PREUX

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS :

ABOYANS Victor
ACHARD Jean-Michel
ADENIS Jean-Paul (CS)
ALAIN Sophie
ALDIGIER Jean-Claude
ARCHAMBEAUD Françoise (CS)
ARNAUD Jean-Paul

AUBARD Yves (CS)
BEDANE Christophe
BERTIN Philippe (CS)
BESSEDE Jean-Pierre (CS)
BONNAUD François
BONNETBLANC Jean-Marie (CS)
BORDESSOULE Dominique (CS)
CHARISSOUX Jean-Louis

CLAVERE Pierre(CS)
CLEMENT Jean-Pierre (CS)
COGNE Michel (CS)
COLOMBEAU Pierre
CORNU Elisabeth

COURATIER Philippe (CS)
DANTOINE Thierry

DARDE Marie-Laure (CS)
DAVIET Jean-Christophe
DESCAZEAUD Aurélien
DESSPORT Jean-Claude
DRUET-CABANAC Michel (CS)
DUMAS Jean-Philippe (CS)
DUMONT Daniel
ESSIG Marie
FAUCHAIS Anne-Laure
FEISS Pierre (SUR. 31.08.2013)
FEUILLARD Jean (CS)
FOURCADE Laurent (CS)
FUNALOT Benoît
GAINANT Alain (CS)
GUIGONIS Vincent
JACCARD Arnaud
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile

CARDIOLOGIE
PHYSIOLOGIE
OPHTALMOLOGIE
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
NEPHROLOGIE
MEDECINE INTERNE
CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET
TRAUMATOLOGIQUE
GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
THERAPEUTIQUE
O.R.L.
PNEUMOLOGIE
DERMATOLOGIE - VENEREOLOGIE
HEMATOLOGIE
CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET
TRAUMATOLOGIQUE
RADIOTHERAPIE
PSYCHIATRIE D'ADULTES
IMMUNOLOGIE
UROLOGIE
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-
VASCULAIRE
NEUROLOGIE
GERIATRIE ET BIOLOGIE DU
VIEILLISSEMENT
PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
UROLOGIE
NUTRITION
MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
UROLOGIE
MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
NEPHROLOGIE
MEDECINE INTERNE
ANESTHESIOLOGIE- REANIMATION
HEMATOLOGIE
CHIRURGIE INFANTILE
BIOCHIMIE et BILOGIE MOLECULAIRE
CHIRURGIE DIGESTIVE
PEDIATRIE
HEMATOLOGIE
IMMUNOLOGIE

LABROUSSE François (CS)

LACROIX Philippe

LASKAR Marc (CS)

LIENHARDT-ROUSSIE Anne (CS)

LOUSTAUD-RATTI Véronique

MABIT Christian (CS)

MAGY Laurent

MARQUET Pierre

MATHONNET Muriel

MAUBON Antoine (CS)

MELLONI Boris (CS)

MERLE Louis (CS)

MONTEIL Jacques (CS)

MOREAU Jean-Jacques (CS)

MOULIES Dominique

MOUNAYER Charbel

NATHAN-DENIZOT Nathalie (CS)

PARAF François

PLOY Marie-Cécile (CS)

PREUX Pierre-Marie

ROBERT Pierre-Yves

SALLE Jean-Yves (CS)

SAUTEREAU Denis (CS)

STURTZ Franck (CS)

TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre

TREVES Richard

TUBIANA-MATHIEU Nicole (CS)

VALLAT Jean-Michel

VALLEIX Denis

VERGNENEGRE Alain (CS)

VIDAL Elisabeth (CS)

VIGNON Philippe (CS)

VIROT Patrice (CS)

WEINBRECK Pierre (CS)

YARDIN Catherine (CS)

ANATOMIE et CYTOLOGIE

PATHOLOGIQUES

MEDECINE VASCULAIRE

CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-

VASCULAIRE

PEDIATRIE

HEPATOLOGIE

ANATOMIE

NEUROLOGIE

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

CHIRURGIE DIGESTIVE

RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE

PNEUMOLOGIE

PHARMACOLOGIE CLINIQUE

BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE

NEUROCHIRURGIE

CHIRURGIE INFANTILE

RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE

ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION

MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE

ET PREVENTION

OPHTALMOLOGIE

MEDECINE PHYSIQUE ET DE

READAPTATION

GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET

MALADIES METABOLIQUES

RHUMATOLOGIE

CANCEROLOGIE

NEUROLOGIE

ANATOMIE CHIRURGIE GENERALE

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE

DE LA SANTE et PREVENTION

MEDECINE INTERNE

REANIMATION

CARDIOLOGIE

MALADIES INFECTIEUSES

CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel

ANTONINI Marie-Thérèse (CS)

BOURTHOUMIEU Sylvie

BOUTEILLE Bernard

CHABLE Hélène

DURAND-FONTANIER Sylvaine

ESCLAIRE Françoise

FUZIER Régis

HANTZ Sébastien

LAROCHE Marie-Laure

LE GUYADER Alexandre

MARIN Benoît

MOUNIER Marcelle

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

PHYSIOLOGIE

CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)

BIOLOGIE CELLULAIRE

ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

PHARMACOLOGIE CLINIQUE

CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-

VASCULAIRE

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et

PREVENTION

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE

HOSPITALIERE

PICARD Nicolas
QUELVEN-BERTIN Isabelle
TERRO Faraj
VERGNE-SALLE Pascale
VINCENT François

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE
THERAPEUTIQUE
PHYSIOLOGIE

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

CAIRE François

NEUROCHIRURGIE

P.R.A.G

GAUTIER Sylvie

ANGLAIS

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

BUCHON Daniel
BUISSON Jean-Gabriel

MEDECINE GENERALE
MEDECINE GENERALE

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

DUMOITIER Nathalie
MENARD Dominique
PREVOST Martine

MEDECINE GENERALE
MEDECINE GENERALE
MEDECINE GENERALE

REMERCIEMENTS

A notre président de thèse

Madame le Professeur Nathan-Denizot

Professeur des Universités d'Anesthésie et Réanimation chirurgicale

Médecin des Hôpitaux

Chef de service

Vous nous faites l'honneur de présider notre jury et nous vous en remercions.

Merci pour la qualité de votre enseignement, votre encadrement et votre engagement au quotidien auprès des patients.

Soyez assurée de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A nos juges

Monsieur le Professeur Vignon

Professeur des Universités de Réanimation médicale

Médecins des Hôpitaux

Chef de service

Vous avez accepté de juger ce travail et nous vous en remercions.

Merci pour la qualité de votre enseignement aussi bien théorique que pratique ainsi que pour votre disponibilité. Votre puissance de travail reste un modèle pour nous.

Soyez assuré de notre plus haute considération.

Monsieur le Professeur Beaulieu

Professeur des Universités d'Anesthésie et Réanimation chirurgicale

Médecin des Hôpitaux

Vous avez accepté de juger ce travail (malgré la distance) et nous vous en remercions.

Pendant votre année passée dans notre hôpital (trop courte de l'avis de tous), vous nous avez fait bénéficier de vos connaissances, de votre sens clinique et de votre gentillesse toute transatlantique !

Soyez assuré de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Monsieur le Professeur Feuillard

Professeur des Universités d'Hématologie Biologique

Médecin des Hôpitaux

Chef de service

Vous avez accepté de juger notre travail et nous vous en remercions.

Merci de m'avoir permis de découvrir une toute autre partie de la médecine.

Soyez assuré de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A notre directeur de thèse

Monsieur le Docteur François

Médecin des Hôpitaux – Réanimateur

Bruno, merci d'avoir accepté de me diriger dans ce travail.

Vos connaissances, votre sens clinique, votre exigence et votre dévouement au quotidien sont autant de qualités que tout réanimateur aimerait avoir.

Vous avez donné le goût de la réanimation à des générations d'externes et d'internes.

Puissions-nous exercer dans le respect de vos enseignements.

A mes Co-internes et amis

Ces 5 années auprès de vous furent un vrai bonheur. Tous différents mais complémentaires. Je garde en mémoire de nombreux fous rires et quelques « coups de gueule », tous mémorables.

Pauline, merci d'avoir rejoint notre promo (pour parler chiffons !). Au fait qui est ton sénior ce soir ???

Mon petit Rémy, sous des dehors calmes et gentils, un sacré caractère...

Greg, la même remarque en sens inverse !

Yo (ou plutôt chef !), prépare-toi à passer de mauvaises gardes...

Puissions-nous garder ces relations privilégiées dans l'avenir.

Aux CCA et internes du DAR

La solidarité et la bonne humeur nous caractérisent dans n'importe quelle situation.

Merci pour ces 5 années...

Aux PH d'Anesthésie, de Réanimation et du SAMU 87

Merci pour votre accueil et votre encadrement durant ces 5 années.

Une pensée spéciale pour le Docteur Peze, merci de m'avoir soutenue moralement durant les derniers mois (ça y est la dernière page est enfin écrite !)

Au personnel d'Anesthésie, de réanimation et du SAMU

Merci pour votre gentillesse et votre soutien, au cours de ces 5 années, à toute heure du jour et de la nuit (surtout !).

A Estelle Guérin

Merci Estelle pour tous tes précieux conseils, tes nombreuses explications « hématologiques », ta patience et ta disponibilité tout au long de ces derniers mois.

A Christelle Parrat

Merci Christelle pour toute l'aide que tu as pu m'apporter dans la réalisation de ce travail.

A mes parents

Vous êtes mes repères et mes modèles. Vous nous avez toujours tout donné et tout fait pour nous dans les moments de joie comme dans les moments plus douloureux.

Vous m'avez enseignée le respect, l'honnêteté, le travail, j'espère ne jamais vous décevoir.

A mes sœurs

Mathilde et Jeanne, vous êtes ce que j'ai de plus proche. J'ai le souvenir d'une enfance formidable à vos côtés.

J'espère (mais j'en suis sûre), que l'âge adulte nous permettra de garder cette complicité et cette proximité.

A ma grand-mère

On dit souvent que l'on ne s'arrange pas en vieillissant. Tu dois être l'exception qui confirme la règle.

Merci pour ton soutien inconditionnel.

A mes oncles, tantes et nombreux cousins...

Malgré la distance qui nous sépare, nous avons toujours su nous réunir en famille pour de nombreuses occasions ou vacances.

J'espère que l'avenir nous permettra de continuer ces traditions.

A la mémoire de ceux qui ne sont plus là.

A mes amies

Paupau, Fifi, Cécile, Pauline et Anne Claire vous avez toujours été là dans les moments de joie comme de peine. Je ne vous dirai jamais assez merci.

A toutes nos soirées passées et futures...

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	6
SOMMAIRE.....	15
INTRODUCTION	18
GENERALITES	20
1. Le Sepsis.....	21
1.1. Définitions	21
1.2. Epidémiologie	22
1.3. Physiopathologie	24
1.4. Diagnostic.....	28
1.5. Facteurs pronostiques	32
2. Intérêt et monitoring de l'immunité.....	36
2.1. Préambule.....	36
2.2. Tests fonctionnels.....	36
2.3. Monitoring cellulaire	37
2.4. Monitoring de l'apoptose cellulaire	39
3. La cytométrie en flux	40
3.1. Définitions	40
3.2. Historique	40
3.3. Principe.....	41
3.4. Avantages et limites	44
3.5. Champs d'application.....	44
3.6. L'immunophénotypage	45
4. Application de l'immunophénotypage étendu des leucocytes au Sepsis	47
4.1. Intérêt et faisabilité.....	47
4.2. Intérêt des marqueurs étudiés	48

4.3. Perspectives d'avenir.....	52
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	54
PATIENTS ET METHODES.....	56
1. Type d'étude.....	57
2. Population étudiée	57
2.1. Critères d'inclusion	57
2.2. Critères d'exclusion.....	58
3. Méthodes	58
3.1. Caractéristiques des patients	58
3.2. Revue du dossier des patients : codage	59
3.3. Modalités de l'immunophénotypage leucocytaire	62
4. Méthodes statistiques	66
4.1. Analyse descriptive	66
4.2. Analyse des paramètres hématologiques.....	66
5. Aspects réglementaires et financiers	66
6. Aspects éthiques	66
RESULTATS	68
1. Schéma de l'étude	69
2. Caractéristiques de la population	70
2.1. Population générale	70
2.2. Comparaison des groupes à l'inclusion.....	74
3. Données hématologiques.....	79
3.1. Populations leucocytaires globales.....	79
3.2. Immunophénotypage leucocytaire : analyse diagnostique.....	79
3.3. Immunophénotypage leucocytaire : analyse pronostique	85
3.4. Populations leucocytaires d'intérêt dans l'étude	90
3.5. Exemples de profils cellulaires.....	91

DISCUSSION.....	92
1. Problématique.....	93
2. Caractéristiques de la population	94
3. Données hématologiques : diagnostic et pronostic	96
3.1. Granulocytes immatures et activés.....	96
3.2. Population monocyttaire.....	98
3.3. Les lymphocytes.....	99
3.4. Les cellules dendritiques	100
4. Limites de l'étude	101
5. Points forts de l'étude.....	101
CONCLUSION	103
ANNEXES	105
BIBLIOGRAPHIE	108
TABLE DES MATIERES.....	117
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	122

INTRODUCTION

Le Sepsis est la deuxième cause de décès dans les services de réanimation. Depuis 20 ans son incidence croît progressivement, en rapport avec le vieillissement de la population et les comorbidités qui en découlent. La mortalité du Sepsis en général reste très élevée malgré les progrès effectués en termes de réanimation. La physiopathologie du Sepsis demeure encore partiellement élucidée de nos jours.

Le diagnostic de Sepsis repose sur de nombreux critères cliniques, hémodynamiques et biologiques, peu sensibles et peu spécifiques pris isolément. Les nombreux travaux expérimentaux réalisés ces dernières années contrastent avec le peu de données hématologiques prises en compte par les cliniciens en pratique courante (essentiellement le nombre de polynucléaires neutrophiles et de plaquettes). De ce fait un outil biologique reflétant le statut immunitaire du patient pourrait s'avérer précieux tant pour la compréhension physiopathologique du Sepsis, que pour son diagnostic et le pronostic du malade.

Les travaux de cytométrie en flux s'attachent à définir les phénotypes cellulaires et à étudier l'état de la réponse immunitaire cellulaire à travers l'expression de marqueurs de surface. Elle autorise une analyse rapide du profil cellulaire par immunophénotypage étendu, permettant ainsi de quantifier de nombreuses sous-populations sanguines circulantes. Cependant, peu de données dans la littérature concernent la faisabilité et l'intérêt d'une telle analyse des leucocytes circulants chez le patient septique.

Ainsi la caractérisation phénotypique des leucocytes par cytométrie en flux, technique déjà validée en hématologie biologique, pourrait dans le Sepsis être un atout supplémentaire reflétant le profil de la dysfonction immunitaire du patient permettant une prise en charge précoce dans les premières heures du Sepsis.

GENERALITES

1. Le Sepsis

1.1. Définitions

Le Sepsis est un syndrome décrivant des symptômes et des signes cliniques hétérogènes en réponse à une infection. Il s'agit d'un phénomène relatant la réaction de l'hôte au pathogène (mais cette situation inflammatoire est non spécifique au Sepsis : pancréatite, polytraumatisme...). Ce terme reste cependant imparfait quant à son pouvoir diagnostique et pronostique.

En 2001, l' « American College of Chest Physicians » et la « Society of Critical Care Medicine » (ACCP et SCCM) ont élaboré une conférence de consensus dans l'optique d'obtenir une définition pratique et conceptuelle de la réponse inflammatoire systémique à une infection jusqu'alors appelée communément « sepsis » [1,2]. Elle permettrait de diagnostiquer, monitorer et traiter les Sepsis de façon plus précoce et standardisée.

Ces définitions restent cependant imparfaites tant cette pathologie est variable d'un individu à l'autre.

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) à une agression qu'elle soit infectieuse ou non est défini par la présence de deux critères :

- Température > 38° ou < 36°
- Fréquence cardiaque > 90 battements/min
- Fréquence respiratoire > 20/min ou une PaCO₂ < 32 mmHg
- Globules blancs > 12000/mm³ ou < 4000/mm³

Le Sepsis correspond à l'association d'un SRIS et d'une infection (processus pathologique causé par une invasion des tissus, fluides ou cavités normalement stériles par un microorganisme pathogène ou potentiellement pathogène).

Le Sepsis sévère est défini comme l'association d'un Sepsis et au moins d'une dysfonction d'organe ou d'un signe d'hypoperfusion tissulaire (apparu dans les 12 heures et imputable au sepsis).

Le choc septique correspond à un Sepsis avec une défaillance circulatoire (hypotension artérielle persistante : pression artérielle systolique < 90 mmHg (PAS) ou pression artérielle moyenne < 60 mmHg (PAM) ou une diminution de plus de 40 mmHg malgré un remplissage vasculaire adéquat, ou la nécessité d'un support vasopresseur.

Les défaillances d'organes sont décrites comme suit :

- Défaillance circulatoire : PAM < 60 mmHg ou hyperlactatémie > 2 mmol/L
- Défaillance respiratoire : PaO₂/FiO₂ < 300
- Défaillance neurologique : encéphalopathie ou syndrome confusionnel ou score de Glasgow < 14
- Défaillance rénale : diurèse < 0,5mL/kg/H pendant 2 heures malgré le remplissage
- Défaillance hématologique : thrombopénie < 100000/mm³ ou coagulation intra vasculaire disséminée.

1.2. Epidémiologie

Le Sepsis est un problème majeur de santé publique. Il est l'un des premiers motifs d'admission en réanimation dans le monde [3]. Cependant son incidence reste difficile à estimer du fait de son extrême variabilité.

Une étude en 1995 montrait que 68% des patients médicaux pris en charge à l'hôpital avaient des critères de SRIS, 26% développaient un Sepsis, 18% un Sepsis sévère et 4% un choc septique [4].

L'étude française EPISEPSIS retrouvait une incidence du Sepsis sévère à 95/100000 habitants [5]. Une autre étude menée aux Etats Unis objectivait une incidence du Sepsis sévère à 81/100000 habitants(6). Celle-ci est en constante augmentation depuis 20 ans probablement expliquée par le vieillissement de la population et l'accroissement des comorbidités associées (immunosuppression, diabète...) [7,8].

La mortalité de ces syndromes reste effroyable allant de 20% à 50% selon les études [9] (figures 1 et 2).

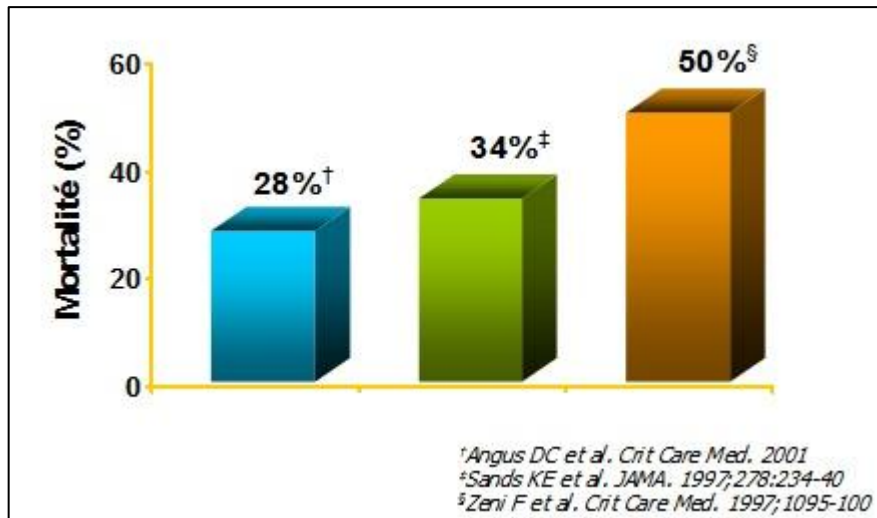


Figure 1: Mortalité du Sepsis

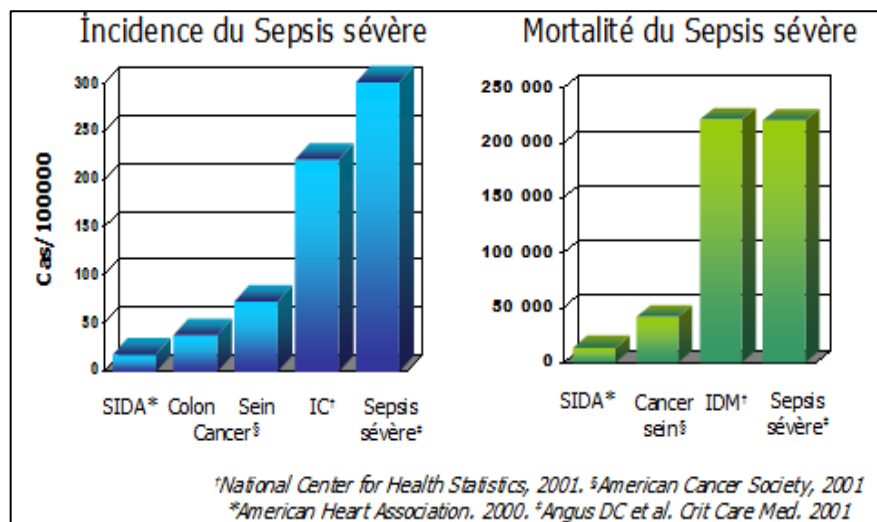


Figure 2 : Incidence et mortalité du Sepsis sévère

Néanmoins celle-ci semble être en constante diminution probablement du fait de sa meilleure reconnaissance, de la précocité de la réanimation, de l'antibiothérapie, de la corticothérapie à faible dose, du contrôle glycémique ou de l'introduction de nouvelles thérapeutiques (protéine C activée par exemple).

Le Sepsis reste cependant la deuxième cause de mortalité en réanimation non cardiologique de nos jours [10].

1.3. Physiopathologie

1.3.1. Réponse immunitaire « normale » à l'infection

Les agents pathogènes sont des microorganismes capables d'infecter d'autres organismes. Leur agressivité dépend de leur virulence, du site infecté et de leurs propriétés offensives. Lors d'une agression infectieuse, l'inflammation résulte de la capacité de ces microorganismes à envahir l'hôte localement ou de façon systémique [11]. Cette réponse immuno-inflammatoire repose sur des composantes immunitaires innées et adaptatives.

La réponse immunitaire innée (reconnaissance hôte-pathogène) est médiée par les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules expriment des récepteurs cellulaires (« Pattern Recognition Receptors », parmi eux les Toll Like Receptors médiateurs clés, le CD14 soluble...) reconnaissant des motifs microbiens (« Pathogen-Associated Molecular Patterns », parmi eux les Lipopolysaccharides, le peptidoglycane...) [12]. Leurs interactions vont déclencher des cascades de signaux dans les cellules immunitaires (conduisant à leur activation), dans les cellules endothéliales et au niveau du système endocrinien, avec notamment la libération de cytokines pro-inflammatoires initiant ainsi la réponse inflammatoire à l'infection. Celles-ci comme l'interleukine-1 (IL), l'IL-6 et le « Tumor Necrosis Factor α » (TNF α) sont capables de produire à leur tour d'autres molécules (médiateurs lipidiques, monoxyde d'azote, radicaux libres de l'oxygène impliqués dans les dysfonctions d'organes) [13]. Elles peuvent de même induire des phénomènes apoptotiques au niveau des cellules immunitaires. Elles provoquent par ailleurs l'activation des cellules endothéliales (celles-ci exprimant d'autres molécules impliquées dans l'adhésion des leucocytes circulants à l'endothélium, première étape de leur migration vers les tissus périphériques), jouant ainsi un rôle central dans l'atteinte micro vasculaire du sepsis [14].

Parallèlement, les macrophages et les cellules dendritiques (cellules intervenant aussi bien dans la réponse immunitaire innée qu'adaptative et de ce fait assurant le lien entre les deux) sont capables de présenter les composants antigéniques pathogènes aux lymphocytes B et aux lymphocytes T caractérisant la réponse immunitaires adaptative ou spécifique.

Les lymphocytes B expriment ainsi des anticorps solubles (immunoglobulines) et membranaires, qui sont les principaux effecteurs de la réponse humorale et de la communication intercellulaire.

Les lymphocytes T quant à eux, utilisent un « T cell receptor » de surface pour la reconnaissance des cellules infectées. Les lymphocytes T se divisent en deux classes : les

lymphocytes T CD8+ cytotoxiques tuant les cellules infectées via des mécanismes d'apoptose et les lymphocytes T CD4+ ou « helpers ». Ces derniers se divisent eux même en lymphocytes Th1 (sécrétant des cytokines pro-inflammatoires) et Th2 (sécrétant des cytokines anti-inflammatoires) [15].

Ainsi la réponse immunitaire à une infection est constituée de deux phases probablement successives (figure 3) : une phase dite pro-inflammatoire débutant dans les premières heures du Sepsis et responsable du SRIS, et une phase dite anti-inflammatoire compensatrice (CARS) survenant plus tardivement [16]. Le choc septique correspond au maximum à une dérégulation de ces deux phases successives contribuant ainsi à la défaillance multi viscérale et au décès [17].

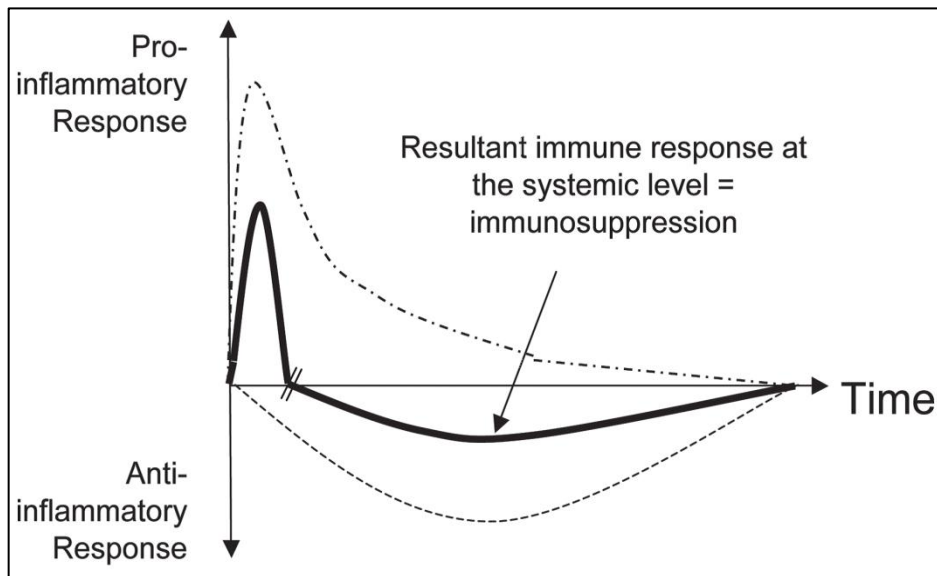


Figure 3 : Phases pro et anti-inflammatoires au cours du Sepsis d'après Monneret [18]

1.3.2. La théorie de l'hyperinflammation

La théorie ancienne considérait que le choc septique représentait essentiellement une réponse inflammatoire incontrôlée et explosive de l'organisme à un processus infectieux. Selon Lewis Thomas, « *c'est notre réponse à la présence des agents infectieux qui fait la maladie. Notre arsenal pour combattre les bactéries est si puissant que nous sommes plus en danger de nous-même que des envahisseurs* » [19]. Cette théorie repose sur des modèles animaux recevant de fortes doses de matériels bactériens et d'endotoxines provoquant ainsi

une réelle « tempête cytokinique », concomitante à l'activation des systèmes du complément et de la coagulation [20]. Cette activation cellulaire peut s'auto-amplifier de façon incontrôlable, évoluant à l'échelle des organes (qu'ils soient infectés ou non) vers une défaillance élective, voire à l'échelle de l'organisme vers un état de défaillance poly viscérale. Cette situation se retrouve en pratique peu fréquemment chez l'humain hormis dans des conditions infectieuses particulières (par exemple le purpura fulminans méningococcique) [21].

Pour étayer cette hypothèse plusieurs travaux ont été réalisés ces dernières années, en se basant sur le concept d'une diminution de la gravité du Sepsis en bloquant l'inflammation par différents traitements anti-inflammatoires. Ces essais thérapeutiques dans ce domaine ont échoué à montrer un résultat positif [22,23].

1.3.3. La théorie de l'immunosuppression

Il est maintenant admis que le Sepsis s'accompagne également d'une réponse anti-inflammatoire entraînant un véritable état d'immunodépression avec impossibilité pour l'organisme à éradiquer l'infection primaire et prédisposant les patients septiques aux infections nosocomiales [24].

Cette phase est médiée par des cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-4 et l'IL-10, libérées par l'activation prépondérante des lymphocytes T CD4 de type Th2 et inhibant ainsi la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires [25].

Par ailleurs il existe un fort degré d'apoptose des cellules de l'immunité innée ou acquise (notamment des macrophages, des lymphocytes CD4, des lymphocytes B et des cellules folliculaires dendritiques) responsable d'un véritable état d'anergie immunitaire [17].

Les diverses études réalisées notent aussi une dysfonction des cellules mononuclées présentatrices d'antigènes. En effet il est décrit une diminution de l'expression du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II (CMH II) sur ces cellules, modulée par les cytokines anti-inflammatoires [26]. Ce défaut d'expression est dû à une ré-endocytose et à la séquestration intra cellulaire de ces molécules. Des études mettent en évidence que l'administration d'anticorps monoclonal anti IL-10 augmente l'expression du CMH II dans le choc septique [27].

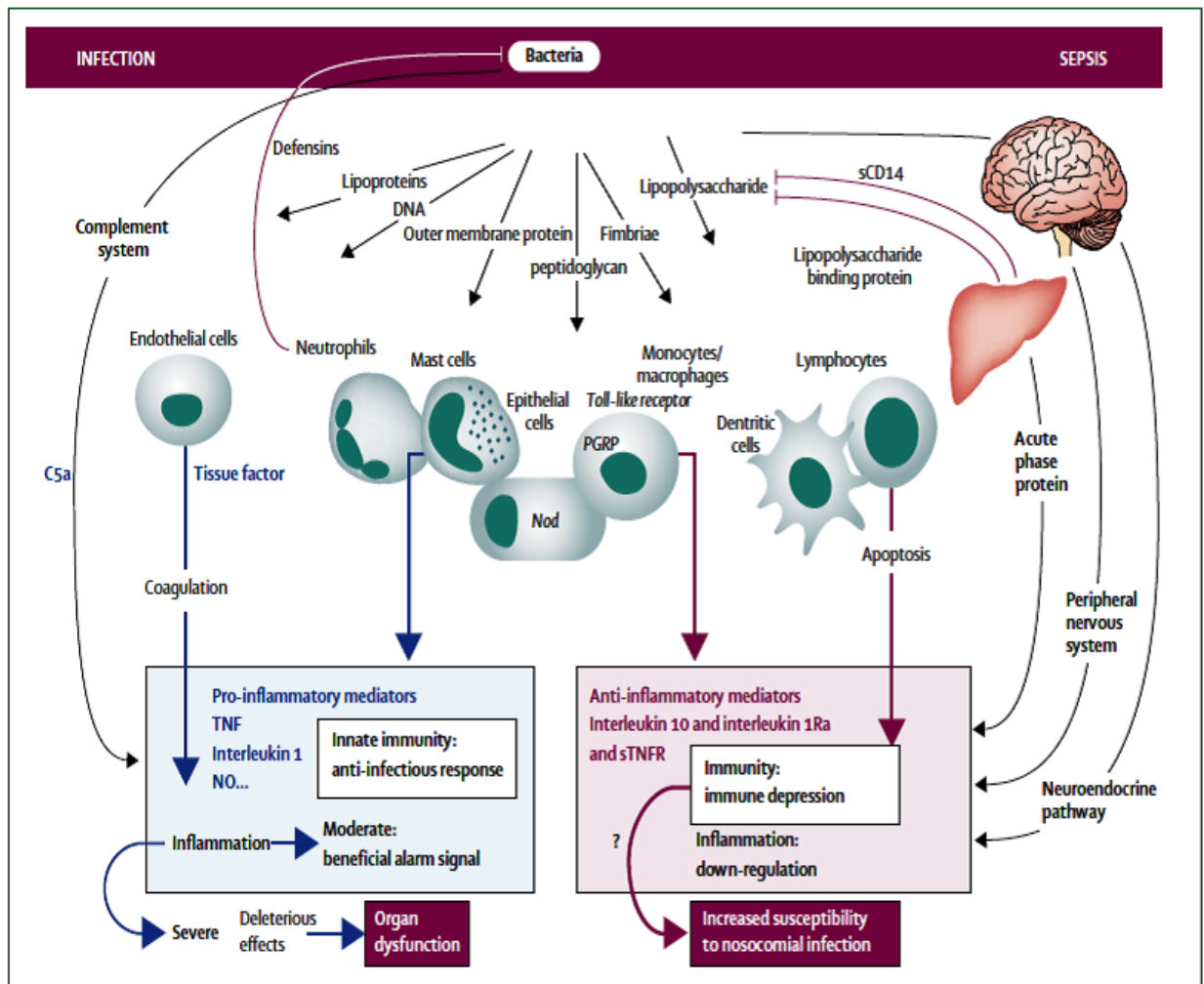


Figure 4 : Physiopathologie du choc septique d'après Annane [14]

1.3.4. Mécanisme de la défaillance d'organe

Sa pathogénèse reste multi factorielle (figure 5). Elle est secondaire à l'activation des cellules immunitaires et endothéliales et notamment des leucocytes, migrant ainsi vers les tissus infectés ou non, et provoquant des lésions en leur sein [28]. Un autre mécanisme possible est celui lié à l'hypoperfusion tissulaire et l'hypoxie (secondaires aux troubles hémodynamiques de la macrocirculation et de la microcirculation).

De plus il semble exister une dysoxie secondaire à une dysfonction de la respiration mitochondriale NO induite conduisant à une hibernation cellulaire au cours du choc septique [17,29].

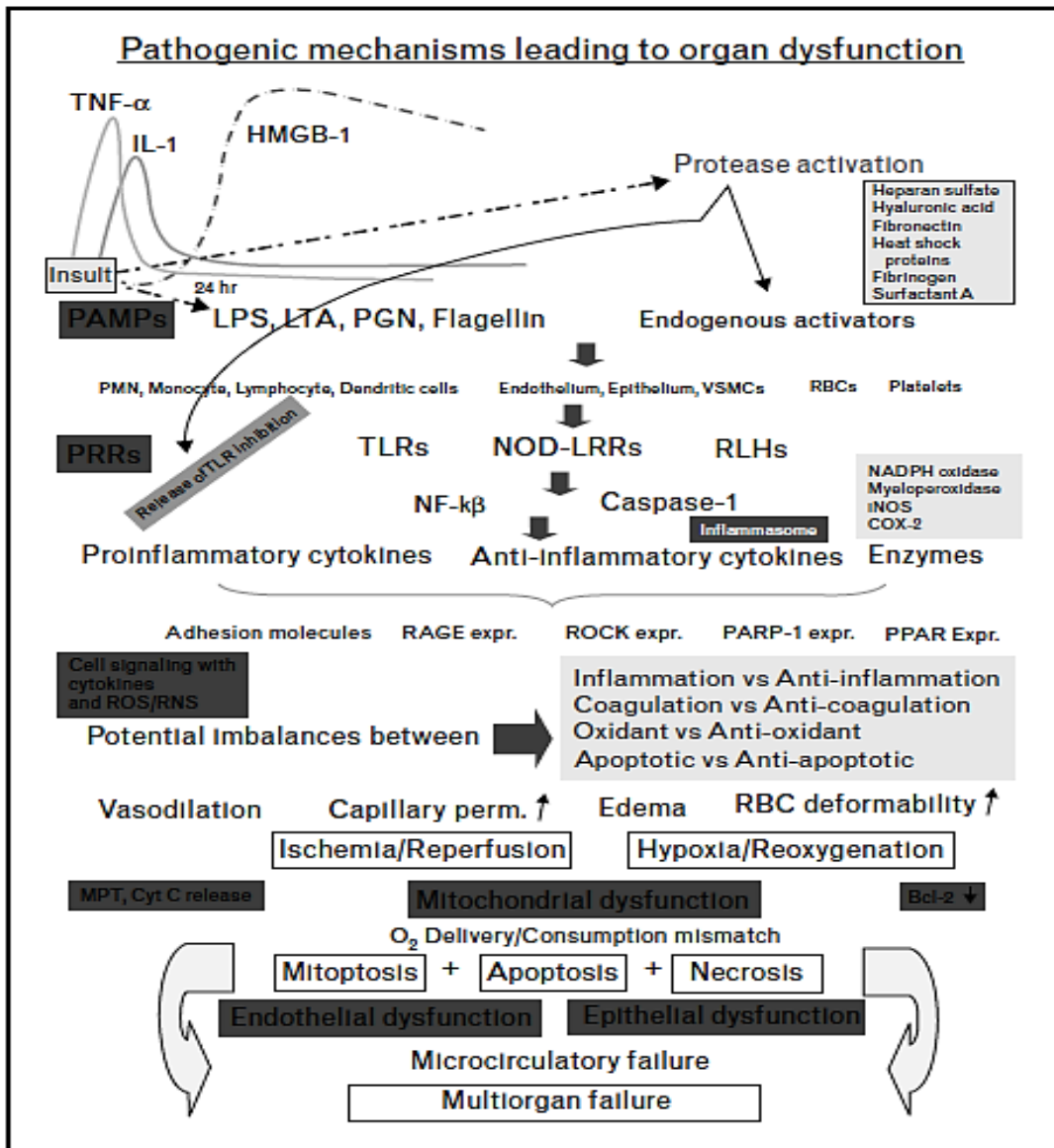


Figure 5 : Mécanisme de la défaillance d'organe d'après Cinel [12]

1.4. Diagnostic

1.4.1. Introduction

Le diagnostic de Sepsis reste un vrai challenge pour les cliniciens. En effet les signes cliniques et biologiques sont très variables et peu spécifiques d'un processus infectieux. Il importe donc d'essayer d'obtenir un diagnostic microbiologique. Ce dernier est souvent long (en moyenne 48 heures) à obtenir et même manquant dans 40 à 50% des cas, retardant ainsi la prise en charge spécifique et aggravant la morbidité du Sepsis [6].

De ce fait de nombreux marqueurs biologiques ont été étudiés au cours de ces dernières années afin d'aider le clinicien au lit du patient. Un total de 178 biomarqueurs a été évalué (dont 101 cliniquement) contre 14 par exemple dans l'infarctus du myocarde. Cette différence s'explique par l'incroyable complexité de la physiopathologie du Sepsis. Ces biomarqueurs peuvent être subdivisés en plusieurs groupes : protéines inflammatoires à la phase aigüe, cytokines, marqueurs cellulaires, récepteurs membranaires ou solubles, marqueurs de la coagulation et de la réactivité vasculaire... Ils pourraient prédire la présence ou l'absence d'un phénomène infectieux ; différencier une infection bactérienne, virale ou fongique. Néanmoins tous ces marqueurs pris isolément n'ont que peu de valeur diagnostique et sont donc à combiner [30].

1.4.2. Les protéines inflammatoires à la phase aigüe

En pratique courante les 2 biomarqueurs les plus utilisés sont la protéine C réactive (CRP) et la procalcitonine (PCT) :

- La CRP est depuis longtemps étudiée comme potentiel marqueur d'infection [31,32]. Elle est produite par les hépatocytes en réponse à l'IL-6, l'IL-1 et le Tumor Growth Factor (TGF) en présence de matériel bactérien. Elle permet l'activation du complément et la phagocytose. Son taux plasmatique s'élève 4 à 6 heures après un stimulus infectieux avec un pic plasmatique obtenu en 36 à 50 heures. Néanmoins son taux s'accroît aussi dans de nombreuses situations inflammatoires non septiques (traumatismes graves, chirurgie lourde...). Elle est donc peu spécifique d'un processus infectieux.

- La PCT, décrite en 1984 comme une protéine aminoacide, est quant à elle exprimée par les leucocytes, les hépatocytes en réponse à la sécrétion de TNF, d'IL-6 ou de LPS. Son taux augmente précocement (2 heures après le début de l'agression avec un pic entre 12 et 24 heures). Sa spécificité et sa sensibilité restent peu élevées, en moyenne inférieure à 90% [1,33]. En effet elle est aussi augmentée dans d'autres pathologies inflammatoires non septiques. En revanche elle bénéficie d'une excellente valeur prédictive négative d'infection de 99% lorsque son taux est inférieur à 0,2 ng/mL. Une méta-analyse de 2004, comparant la CRP et la PCT comme marqueur diagnostique de Sepsis, montrait une supériorité de cette dernière en termes de spécificité (81% versus 67%) et de sensibilité (88% versus 75%) [34].

A ce jour le plus pertinent en termes de discrimination d'un processus infectieux et le plus facilement utilisable en pratique courante reste probablement la PCT [35,36].

1.4.3. Les cytokines

Les cytokines sont des médiateurs circulants de l'inflammation important impliqués dans la physiopathologie du Sepsis. Elles sont divisées en deux catégories : les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α ...) et les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10...). La plupart sont produites très rapidement après le début d'une agression qu'elle soit infectieuse ou non (figure 6). Beaucoup d'entre elles ont été étudiées dans la littérature comme outil diagnostique dans le Sepsis.

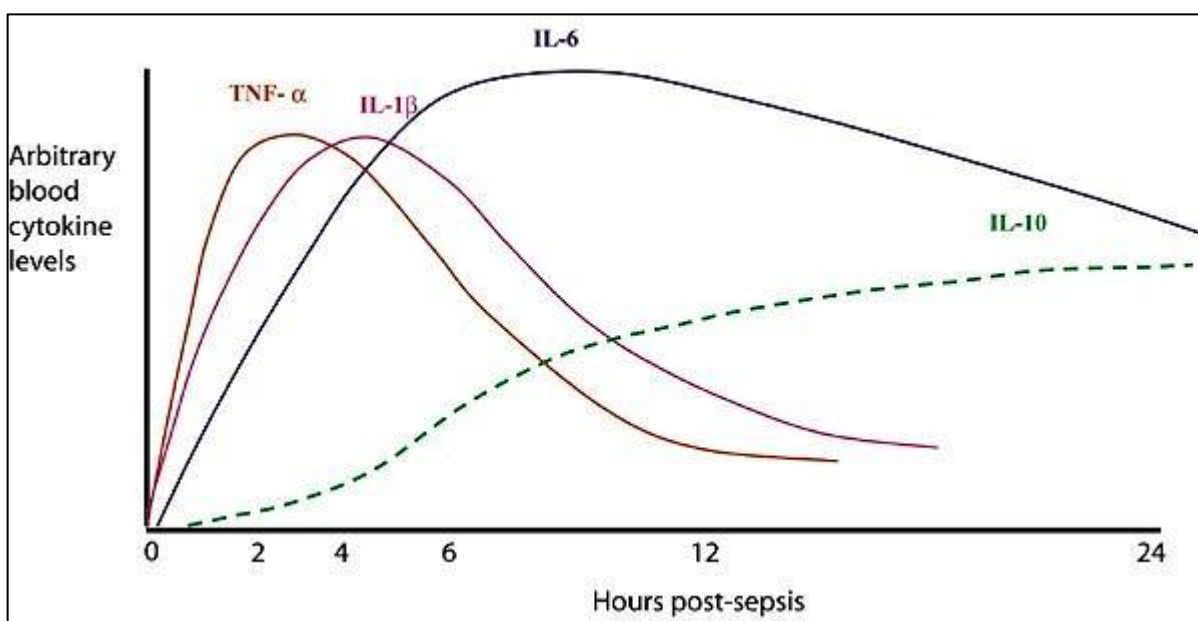


Figure 6 : Taux de cytokines dans la course du Sepsis

Parmi tout le panel de cytokines pro-inflammatoires, l'IL-18 semble être la plus intéressante en termes diagnostiques. En effet plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de sa concentration plasmatique chez les patients septiques. Oberholzer en 2001, par exemple a comparé les taux plasmatiques d'IL-18 entre des patients septiques, des patients traumatisés graves non infectés et des sujets sains. Il a ainsi démontré l'existence d'une augmentation significative du taux plasmatique d'IL-18 chez les patients infectés [37].

Les données expérimentales et cliniques chez l'adulte concernant les autres cytokines pro-inflammatoires sont plus contrastées, notamment celles intéressant le TNF α , l'IL-6. Néanmoins l'IL-6, largement évaluée chez l'enfant et plus particulièrement en néonatalogie, semble pouvoir prédire un processus infectieux avec une sensibilité et spécificité acceptable [38].

Parallèlement, parmi les cytokines anti-inflammatoires, l'IL-10 s'avère être la plus prédictive de la présence d'un processus infectieux chez l'adulte. Par exemple l'étude réalisée par Marchant en 1995 portant sur 27 patients en état de choc retrouvait une augmentation significative du taux plasmatique d'IL-10 lorsque l'état de choc était d'origine septique [39]. Là encore les données de la littérature concernant les autres cytokines anti-inflammatoires sont contrastées et leur utilisation ne peut être recommandée en pratique courante.

En résumé les cytokines apparaissent pour l'instant peu contributives au diagnostic du Sepsis dans la pratique quotidienne, elles reflètent essentiellement le degré d'inflammation au cours du Sepsis.

1.4.4. Autres médiateurs circulants

Beaucoup d'autres médiateurs ont été testés comme outil diagnostique au cours du Sepsis. Toutefois ces derniers ne sont pas indiqués dans la pratique quotidienne. En effet les études dans la littérature, validant leur intérêt sont de faible puissance. De plus leur détermination est souvent onéreuse, difficile et longue.

Parmi ces médiateurs nous pouvons citer par exemple le complément C3a. Des études ont mis en évidence une corrélation entre l'augmentation de sa concentration plasmatique et la présence d'un Sepsis chez des patients présentant des critères de SIRS [40].

Le « Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells » (TREM-1: molécule appartenant à la super famille des immunoglobulines up-régulées en réponse au matériel bactérien), serait spécifique et sensible pour le diagnostic d'un processus infectieux [41]. Celui-ci ne serait pas par ailleurs exprimé lors de maladies inflammatoires ou de SIRS d'origine non infectieuse.

Citons enfin comme exemple l'endocan, marqueur du dommage vasculaire endothélial. Ce biomarqueur est significativement plus élevé chez des patients septiques par rapport à des patients sains ou présentant des critères de SIRS non infectieux [42].

De la même façon tous ces médiateurs circulants ne font pas parti de la démarche diagnostique du Sepsis, du fait de leur faible sensibilité et spécificité.

Ainsi il existe de nombreuses données expérimentales publiées, aussi bien animales qu'humaines, hématologiques (taux de leucocytes immatures, de cellules dendritiques...) contrastant avec celles prises en compte au lit du patient par le clinicien (essentiellement le taux de polynucléaires neutrophiles et les plaquettes sur la numération de formule sanguine standard). De ce fait un outil biologique reflétant le statut immunitaire du patient pourrait s'avérer être utile dans l'aide au diagnostic.

1.5. Facteurs pronostiques

1.5.1. Introduction

Un autre point clé est l'évaluation du potentiel évolutif d'un patient septique et cela de façon précoce. En effet une des causes majeures de retard de prise en charge, de traitement inadapté et donc de morbidité, est une mésestimation de la gravité du patient septique. Là encore les signes cliniques sont très variables et peu prédictifs d'une évolution défavorable.

1.5.2. Le système PIRO

Récemment l'ACCP et la SCCM ont élaboré un nouveau système : le système PIRO [1] (figure 7). Cette nouvelle classification est née du désir d'offrir aux praticiens un modèle plus élaboré pour évaluer le potentiel évolutif des patients septiques. Celui-ci permettrait de stratifier, d'appréhender la gravité du Sepsis et d'homogénéiser le recrutement des patients dans les essais cliniques. Ce système est divisé en 4 domaines différents à prendre en compte : le terrain du patient (l'âge, le sexe, les comorbidités...), l'infection en cause (localisation du sepsis, type de pathogène...), la réponse de l'hôte à l'infection (critères de SIRS...), et enfin la présence ou non de dysfonctions d'organes.

Rubulotta a mené une étude rétrospective, utilisant les patients des études PROWESS et PROGRESS, afin de créer un score composite de gravité et d'évolutivité à partir des quatre composantes du système PIRO [43]. Cette étude a mis en évidence l'intérêt d'un tel score dans l'évaluation du potentiel évolutif des patients. En effet la présence de chaque variable étudiée correspondait à une augmentation du risque de mortalité dans cette population.

Néanmoins la définition des variables à utiliser dans un tel score composite mérite encore d’être appréciée dans des études futures.

Domain	Present	Future	Rationale
Predisposition	Premorbid illness with reduced probability of short term survival. Cultural or religious beliefs, age, sex.	Genetic polymorphisms in components of inflammatory response (e.g., TIR, TNF, IL-1, CD14); enhanced understanding of specific interactions between pathogens and host diseases.	In the present, premorbid factors impact on the potential attributable morbidity and mortality of an acute insult; deleterious consequences of insult heavily dependent on genetic predisposition (future).
Insult infection	Culture and sensitivity of infecting pathogens; detection of disease amenable to source control.	Assay of microbial products (LPS, mannan, bacterial DNA); gene transcript profiles.	Specific therapies directed against inciting insult require demonstration and characterization of that insult.
Response	SIRS, other signs of sepsis, shock, CRP.	Nonspecific markers of activated inflammation (e.g., PCT or IL-6) or impaired host responsiveness (e.g., HLA-DR); specific detection of target of therapy (e.g., protein C, TNF, PAF).	Both mortality risk and potential to respond to therapy vary with nonspecific measures of disease severity (e.g., shock); specific mediator-targeted therapy is predicated on presence and activity of mediator.
Organ dysfunction	Organ dysfunction as number of failing organs or composite score (e.g., MODS, SOFA, LODS, PEMOD, PELOD).	Dynamic measures of cellular response to insult—apoptosis, cytopathic hypoxia, cell stress.	Response to preemptive therapy (e.g., targeting microorganism or early mediator) not possible if damage already present; therapies targeting the injurious cellular process require that it be present.

Figure 7 : Le système PIRO [1]

1.5.3. Les scores cliniques

De la même façon de nombreux scores ont été évalués dans le pronostic des patients septiques notamment le score APACHE II, le SAPS ou le score de SOFA avec plus ou moins de pertinence [9].

Le score APACHE II, constitué de 12 variables physiologiques, est l’un des principaux scores de gravité d’une affection utilisé dans le monde. Il est réalisé à l’admission du patient et tient compte notamment de l’âge, des pathologies chroniques sous-jacentes et du diagnostic d’entrée du patient. Il permet d’estimer la gravité d’une pathologie qu’elle que soit son origine [44]. Ainsi le score APACHE II n’est pas un score spécifique au Sepsis.

Le SOFA, développé en 1994, est un score évaluant les dysfonctions d’organes chez les patients de réanimation. Les dysfonctions prises en compte sont au nombre de 6 : respiratoire, cardio-vasculaire, rénale, hépatique, neurologique et hématologique. Les études réalisées au cours de ces dernières années montrent une forte corrélation entre ce score et

l'apparition d'une évolution défavorable ou la mortalité chez plusieurs groupes de patients et notamment les patients septiques [45,46]. Là encore ce score n'est pas spécifique au Sepsis.

1.5.4. Les protéines inflammatoires à la phase aigue

De nombreux biomarqueurs ont été testés pour évaluer le pronostic des Sepsis. Là encore la CRP et la PCT sont les 2 biomarqueurs les plus utilisés en pratique courante. La PCT serait meilleure en termes pronostiques que la CRP [47].

Néanmoins la CRP peut être utilisée pour juger de l'efficacité d'un traitement antibiotique [32]. De plus des concentrations de CRP élevées sont corrélées à l'augmentation du risque de dysfonction d'organe et à la mortalité chez les patients hospitalisés en réanimation, victimes d'un processus inflammatoire qu'il soit infectieux ou non [48].

Les résultats sont contrastés et insuffisants pour en tenir réellement compte au lit du patient.

1.5.5. Les cytokines

Les études concernant l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-6 ou l'IL-8 n'ont pas prouvé clairement un intérêt pronostique au cours du Sepsis dans la littérature [18]. Néanmoins des auteurs ont démontré qu'il existe un lien entre la diminution de cytokines pro-inflammatoires comme le « Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor » (GM-CSF) et une évolution défavorable des patients septiques notamment en termes de mortalité [49]. D'autres cytokines pro-inflammatoires paraissent avoir un intérêt dans l'évaluation du pronostic des patients septiques. La cytokine « high mobility group box 1 » a été particulièrement étudiée. Elle est un médiateur tardif dans le Sepsis et interagit avec l'apoptose, la dysfonction des cellules dendritiques. Il a été démontré que sa persistance à un taux élevé est associée à une évolution défavorable des patients septiques [50].

Parallèlement il paraît intéressant dans un contexte d'immunosuppression persistante de mesurer la concentration des cytokines anti-inflammatoires. Beaucoup ont été étudiées mais les conclusions les plus probantes concernent l'IL-10. Plusieurs travaux ont reporté que l'IL-10, parmi un panel de cytokines, est la plus prédictive d'une évolution défavorable chez

les patients septiques [51,52]. Elle peut rester élevée jusqu'à 15 jours après un choc septique reflétant de ce fait l'importance de l'immunoparalysie [53].

Beaucoup d'autres médiateurs circulants ont été évalués comme outil pronostique au cours du Sepsis (prostaglandine E2, adrenomedullin, vaso-intestinal peptide...). Les études les concernant sont de faible puissance avec souvent de petits effectifs de patients. Ainsi leur utilisation ne peut être validée dans la pratique quotidienne.

1.5.6. Approche génétique

L'étude du génome humain dans le Sepsis pourrait s'avérer être une nouvelle opportunité dans l'évaluation des patients septiques. En effet depuis plusieurs années le Sepsis est de plus en plus appréhendé comme une maladie polygénique avec de ce fait des facteurs de risques innés mais aussi environnementaux pouvant à leur tour modifier le génome. Ainsi le polymorphisme génétique pourrait expliquer la prédisposition au Sepsis et la sévérité d'un tableau septique chez chaque individu. La plupart des changements constatés concernent une seule base dénommée « Single Nucléotide Polymorphisms » (SNPs au nombre d'environ 8 millions), ou la redondance de séquence d'ADN identique, ou enfin l'absence d'une partie du gène. La majorité des études s'est focalisée sur des polymorphismes présents au sein ou à proximité des gènes codant pour des protéines impliquées dans la physiopathologie du Sepsis et notamment les cytokines, les médiateurs de la coagulation, les molécules engagées dans la reconnaissance des pathogènes et la signalisation cellulaire.

Parmi les cytokines, la majorité des études concerne les polymorphismes du promoteur du TNF α , de l'IL-6, de l'IL-10 et sont contrastées. Par exemple, Schluter en 2002 a retrouvé une association entre la présence d'un polymorphisme en position -174 de la base G du gène de l'IL-6 et une augmentation de la survie chez des patients septiques [54]. En revanche cette association n'a pas été retrouvée dans le travail de Sutherland [55].

L'étude du polymorphisme du récepteur CD14 impliqué dans la reconnaissance du lipopolysaccharide et du peptidoglycane a donné aussi des résultats contrastés quant à sa relation avec une évolution défavorable des patients.

Ainsi les données relatives à la recherche des SNPs sont souvent contradictoires et non reproductibles. De ce fait des équipes se sont attachées à étudier des associations d'haplotypes (défini comme la combinaison d'allèles sur un même chromosome) ou des études

d'associations pangénomiques comme facteurs pronostiques. Là encore les résultats sont peu reproductibles d'une étude à l'autre et non utilisables en pratique courante pour l'instant [56].

Ainsi là aussi, la détermination d'un ou plusieurs profils immunitaires serait utile afin de stratifier et évaluer le potentiel évolutif du patient septique.

2. Intérêt et monitoring de l'immunité

2.1. Préambule

Il est maintenant communément admis que la dysfonction immunitaire présente au cours du Sepsis joue un rôle majeur dans la morbi-mortalité des patients. Initialement il existe une phase pro-inflammatoire marquée dans les premières heures du Sepsis, suivie d'une phase anti-inflammatoire devenant délétère par compromission de l'immunité au fil du temps, prédisposant les patients aux infections nosocomiales secondaires.

Il paraît ainsi primordial dans le futur de pouvoir identifier le statut immunitaire d'un patient septique afin de proposer des traitements appropriés au moment opportun. Aucun signe clinique ne permet de préjuger de ce statut. Il devient donc nécessaire de déterminer les meilleurs outils biologiques autorisant une stratification des patients selon leur profil immunitaire. Parmi ces outils la cytométrie en flux permet d'accéder à un grand nombre de renseignements sur le statut immunitaire des patients.

2.2. Tests fonctionnels

Les tests fonctionnels permettent de mesurer directement *ex vivo* la capacité d'une population cellulaire à répondre à un challenge immunitaire. Ils représentent théoriquement la meilleure méthode pour établir le diagnostic d'immunoparalysie [18]. Ils peuvent mettre en évidence deux types de phénomènes survenant au cours du Sepsis par exemple :

- L'anergie et la diminution de la prolifération lymphocytaire : l'anergie est illustrée par la perte de la réaction d'hypersensibilité au test cutané. Celle-ci est associée à la mortalité et au développement d'infections secondaires [57]. La prolifération lymphocytaire est quant à elle obtenue par des tests nécessitant une longue incubation (de 3 à 7 jours) et ne sont donc pas utilisés en pratique courante.

- La diminution de la capacité des monocytes à produire des cytokines pro-inflammatoires en réponse aux LPS ou au matériel bactérien *in vitro* [58].

Néanmoins ces tests ne sont pas utilisables pour le monitoring immunitaire en routine, ni pour aider le clinicien au lit du patient. Mais ils restent essentiels pour obtenir des renseignements sur la physiopathologie de l'immunosuppression induite par le Sepsis et peuvent aider à valider d'autres marqueurs plus faciles d'accès.

2.3. Monitoring cellulaire

2.3.1. Les cellules présentatrices d'antigènes : cellules dendritiques et monocytes

Les cellules dendritiques sont connues depuis quelques années pour dysfonctionner et pour présenter des phénomènes d'apoptose dans le sepsis, menant les patients à un véritable état d'immunosuppression. Ces événements sont plus marqués chez les patients ne survivant pas au Sepsis [59].

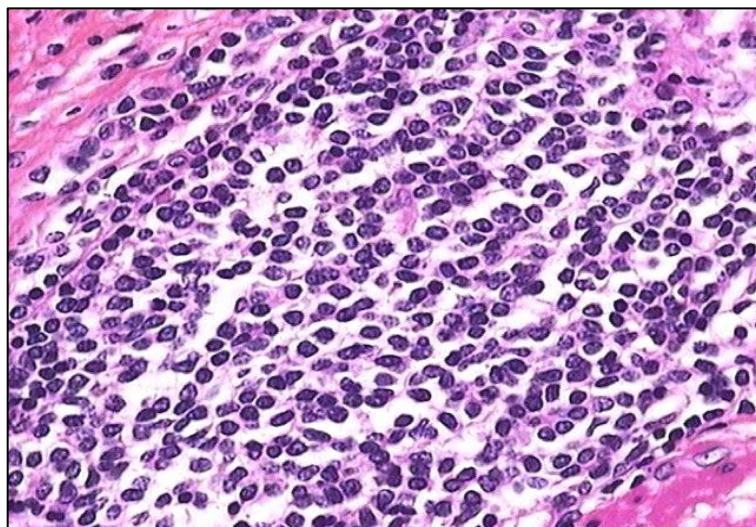


Figure 8 : Cellules dendritiques

Les monocytes circulants quant à eux diminuent leur expression du CMH de type II à leur surface. Ceci témoigne de l'immunosuppression et de la dysfonction monocytaire au cours du Sepsis. Cette diminution d'expression est prédictive de complications infectieuses après un polytraumatisme, une chirurgie majeure ou une pancréatite [60,61,62]. Des résultats similaires sont également retrouvés chez les patients septiques avec un risque accru de développer des infections nosocomiales secondaires si le taux de CMH II sur les monocytes devient et reste inférieur à 40% jusqu'au 7^{ème} jour [63]. Cette différence devient significative notamment en termes de mortalité à la 48^{ème} heure du Sepsis [64].



Figure 9 : Cellule monocytaire

2.3.2. Les lymphocytes

Il a été rapporté au cours des Sepsis graves une diminution du nombre circulants de lymphocytes et des phénomènes d'apoptose notamment chez l'enfant [65]. Celle-ci semble être associée là aussi au développement d'infections nosocomiales secondaires et à la morbi-mortalité des patients. De plus les lymphocytes s'orientent plutôt vers une réponse de type Th2 dite anti-inflammatoire. Celle-ci peut être mesurée par l'étude des marqueurs de surface [66] ou par « Polymerase Chain Reaction" (PCR) [67].

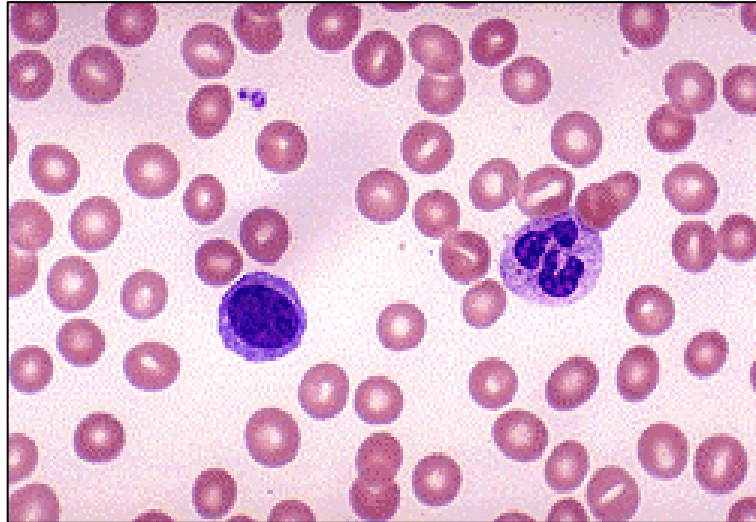


Figure 10 : Cellules lymphocytaires

2.4. Monitoring de l'apoptose cellulaire

L'apoptose est un processus présent au cours du Sepsis et bien connu depuis plusieurs années. Hotchkiss le définit comme une baisse des cellules de l'immunité adaptative dans la rate, le sang et les tissus lymphoïdes des patients septiques décédés [68]. Ce phénomène touche ainsi les cellules lymphocytaires, dendritiques, épithéliales, endothéliales et les monocytes.

Parmi les explorations réalisées pour monitorer l'apoptose par exemple, Bilbault a montré une régulation négative de l'expression du gène anti-apoptotique Bcl2 dans les cellules mononuclées circulantes des patients décédés d'un Sepsis sévère malgré une réanimation adéquate [69]. Celle-ci était associée à une réduction du nombre de cellules T.

D'autres études ont mis en évidence une augmentation du taux sérique des facteurs pro-apoptotiques comme sFas et sFasL chez les patients septiques ainsi qu'une corrélation avec l'apparition d'une défaillance multi-viscérale et le décès [70].

Parmi toutes ces techniques et tentatives d'exploration de l'immunité dans le Sepsis, la cytométrie en flux est une technique permettant d'accéder à un grand nombre de renseignements sur le statut immunitaire des patients. Son utilisation comme outil diagnostique et pronostique dans le Sepsis paraît ainsi intéressante.

3. La cytométrie en flux

3.1. Définitions

La cytométrie en flux (CMF) est une technique qui permet l'analyse simultanée qualitative et quantitative de multiples paramètres physiques d'une cellule dans une population hétérogène en suspension dans un liquide. Elle se définit comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Les cytomètres en flux sont utilisés dans un grand nombre d'applications comme l'immunophénotypage, l'analyse du cycle cellulaire, le comptage des cellules, ou encore la mesure d'expression de protéine de fluorescence verte. Les données sur la cellule recueillies par le cytomètre en flux sont la taille de la cellule (Foward Scatter), sa granularité ou complexité interne relative (Side Scatter), et enfin son intensité relative de fluorescence [71,72].

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représentent sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

3.2. Historique

Les méthodes d'analyse des cellules individuelles sont essentielles pour la compréhension des fonctions des cellules normales et la possibilité de modulation des cellules pathologiques. La CMF est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang. Les origines de la CMF sont anciennes puisque c'est en 1934 que Moldavan conçut le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photo électrique. Dans les années 70, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales [73]. La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires. Le développement simultané d'appareils commercialisés polyvalents et l'apparition des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux a conduit à une explosion des activités impliquant la cytométrie en flux.

L'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, auto fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes ont conduit à la mise en œuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes.

3.3. Principe

Le cytomètre en flux est un instrument complexe qui possède 3 systèmes (figure 11) :

- Le système fluidique qui entraîne et présente l'échantillon cellulaire au point d'interrogation
- Le système optique comprenant les lasers comme source de lumière, et les filtres optiques qui séparent la lumière émise par la cellule et la dirigent vers les détecteurs
- Le système électronique qui va convertir la lumière en signaux électroniques analysables par l'ordinateur.

Cependant, le « cœur » du système est représenté par le point d'interrogation. En effet, c'est là que les cellules traversent le ou les lasers et que le système optique collecte la lumière diffractée et la fluorescence émise par la cellule.

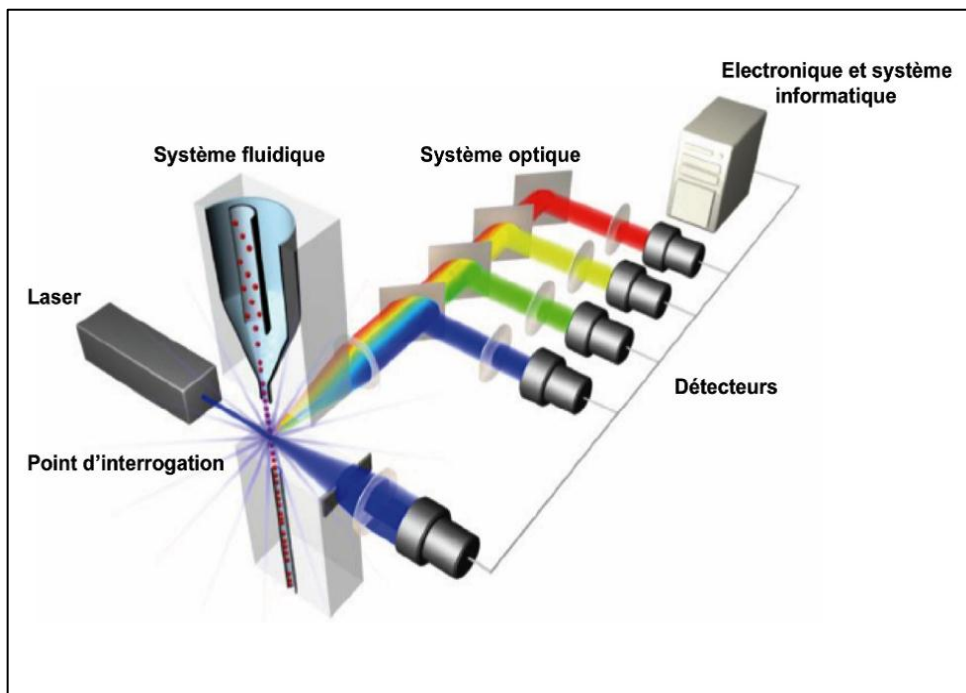


Figure 11 : Différents composants d'un cytomètre en flux

Le passage des cellules les unes derrière les autres, réalisé par le principe de focalisation hydrodynamique est primordial pour une analyse précise des signaux optiques. Le cytomètre en flux analyse les cellules en les faisant défiler à grande vitesse à travers un ou plusieurs faisceaux lumineux. Les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser sont mesurés par l'instrument et sont essentiellement fonction :

- Des propriétés optiques intrinsèques des cellules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la cellule et à leur structure interne. La taille (FSC) et la granularité relative (SSC) des cellules sont ainsi mesurées. Cela permet de séparer les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes.

- Des propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires. En général, des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes sont nécessaires pour ces mesures optiques. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée par vibration et dissipation de chaleur, d'où une émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée (figure 13).

Ces signaux, séparés par des filtres optiques, sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. Une fois que les signaux optiques sont convertis de façon proportionnelle en signaux électroniques puis en chiffres, les données sont stockées dans l'ordinateur sous forme de fichier FCS (flow cytometry standard). Le fichier représente une liste de valeurs numériques de chaque paramètre étudié pour chaque cellule analysée. Les données peuvent être représentées sous forme :

- D'histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules,

- D'histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentant deux signaux simultanément.

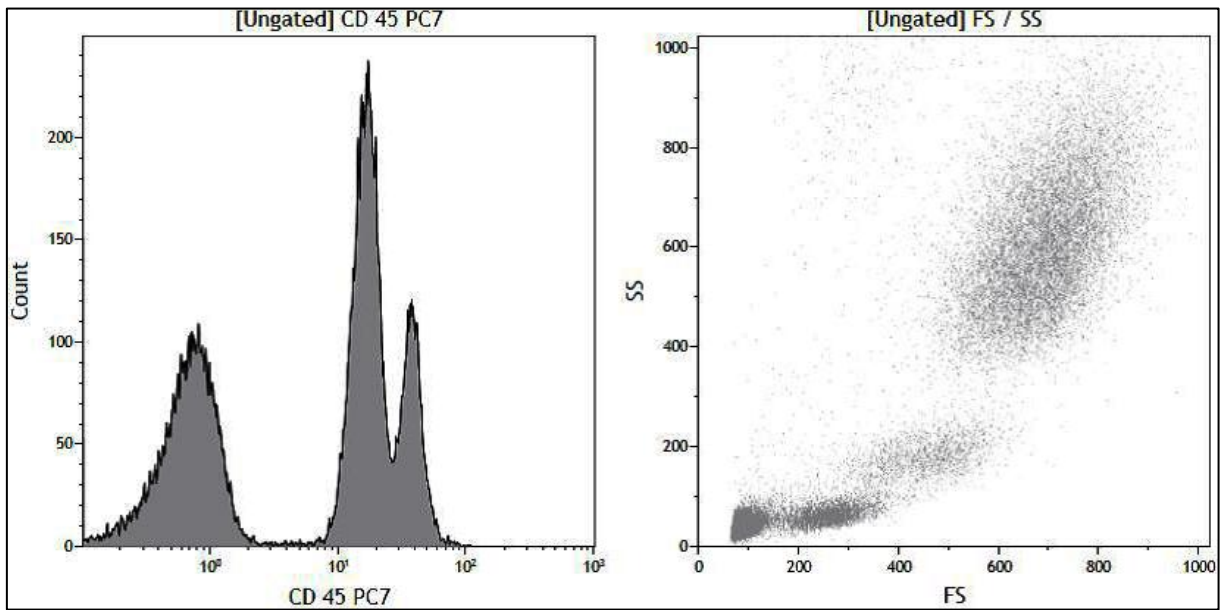


Figure 12 : Exemple d'histogrammes mono et biparamétriques

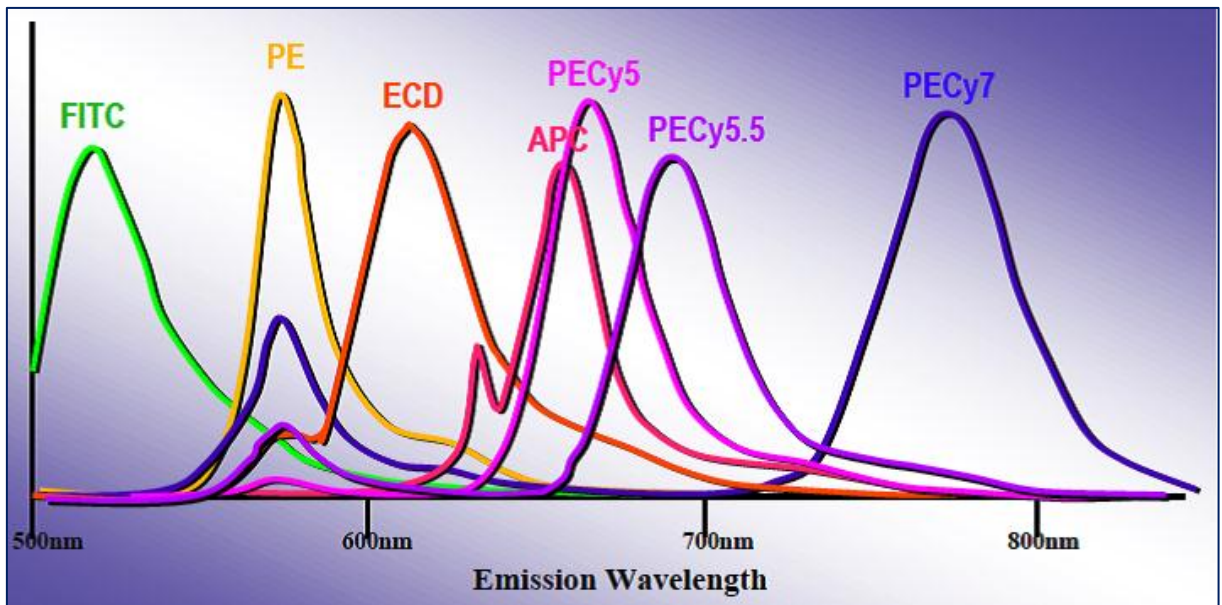


Figure 13 : Exemple de longueur d'onde de différents fluorochromes

3.4. Avantages et limites

La cytométrie en flux réunit cinq caractéristiques essentielles : l'analyse quantitative, la sensibilité de détection, la rapidité, l'analyse multiparamétrique et le tri cellulaire.

- Le 1er avantage très important de la cytométrie en flux est qu'elle permet l'analyse d'un très grand nombre de cellules dans un temps relativement court. Cette vitesse de travail permet d'avoir des statistiques d'analyse bien plus solides et fiables que la microscopie, qui ne peut compter que quelques centaines de cellules. De plus la CMF peut analyser des populations très rares, comme par exemple des cellules souches hématopoïétiques CD34+, qui représentent moins de 0,05% des leucocytes dans le sang [74,75].

- Le 2ème avantage de la CMF est qu'elle permet l'analyse de plusieurs paramètres simultanément au niveau cellulaire. A l'heure actuelle, les meilleurs instruments de cytométrie peuvent mesurer jusqu'à 17 paramètres. Aucune autre méthode d'analyse n'offre autant d'informations et de polyvalence que la CMF.

- Le 3ème avantage est que la CMF, permet une analyse quantitative des paramètres mesurés. En utilisant des billes de calibration avec un nombre connu de molécules fluorescentes, il est possible de créer une courbe d'étalonnage standard, et ensuite de calculer par exemple le nombre de récepteurs CD4 à la surface des cellules, en se basant sur leur intensité de fluorescence [76,77].

- Le 4^{ème} avantage est que la CMF, permet une analyse qualitative. En effet, au microscope, il est difficile de classer des cellules en plus de quatre catégories selon leur fluorescence: "négatives", "faibles", "moyennes", "fortes". Un cytomètre avec amplificateur logarithmique permet de quantifier rigoureusement chaque critère optique sur une gamme de 1 à 10 000 unités arbitraires de fluorescence.

- Enfin, le 5ème avantage qu'offre la cytométrie en flux est que les cellules analysées peuvent être isolées ou triées, de façon stérile, avec des taux de pureté supérieurs à 99% [78].

3.5. Champs d'application

La cytométrie en flux couvre des domaines d'application très larges dans des disciplines très variées telles que l'hématologie (une des premières spécialités médicales à en avoir bénéficié), l'immunologie, la cancérologie et la génétique, autant dans les domaines de la recherche fondamentale que dans ceux de la recherche clinique et des applications

cliniques. La CMF est également utilisée dans des domaines d'études autres que celui de la cellule animale. C'est le cas par exemple de la biologie végétale, de la microbiologie. L'utilisation de cette technologie dans le domaine de la biologie peut se mesurer par le nombre d'ouvrages scientifiques la mentionnant. Le nombre d'articles scientifiques publiés, mentionnant la cytométrie en flux, est passé de 118 dans l'année 1980 à 9332 en 2009.

3.6. L'immunophénotypage

En hématologie, le cytomètre en flux permet de réaliser un immunophénotypage grâce à des anticorps conjugués avec des fluorochromes (substances organiques qui sous l'influence d'une radiation de longueur d'onde donnée émettent une lumière d'onde supérieure). Les anticorps se lient à leurs récepteurs spécifiques à la membrane des cellules. Une combinaison d'anticorps permet d'identifier à la surface d'une cellule plusieurs antigènes et donc des populations cellulaires.

Le principe fondamental de l'analyse informatique en cytométrie en flux s'appelle le « gating » et pourrait se traduire par conditionnement. Le but du gating est de sélectionner sur un cytogramme ou un histogramme monoparamétrique une population cellulaire homogène pour ensuite travailler sur cette population isolément du reste des cellules. Pour cela, on peut tracer un nouveau graphique et assujettir la population affichée sur ce dernier à une « gate » existante. On peut donc réaliser l'immunophénotypage de la population cellulaire d'intérêt (en fonction de la pathologie recherchée, par exemple), sans être parasité par le reste des cellules (figure 14).

Ces dernières années, le développement de la cytométrie multiparamétrique a démontré la complexité incroyable du système immunitaire, en identifiant par exemple des sous-populations de cellules dendritiques myéloïdes, inconnues il y a peu [79,80].

De plus en plus, en association avec l'immunophénotypage, les chercheurs veulent aussi connaître le statut fonctionnel de la cellule, avec par exemple des mesures de cytokines ou des mesures de prolifération cellulaire, afin d'avoir une vision plus complète de la cellule [81,82].

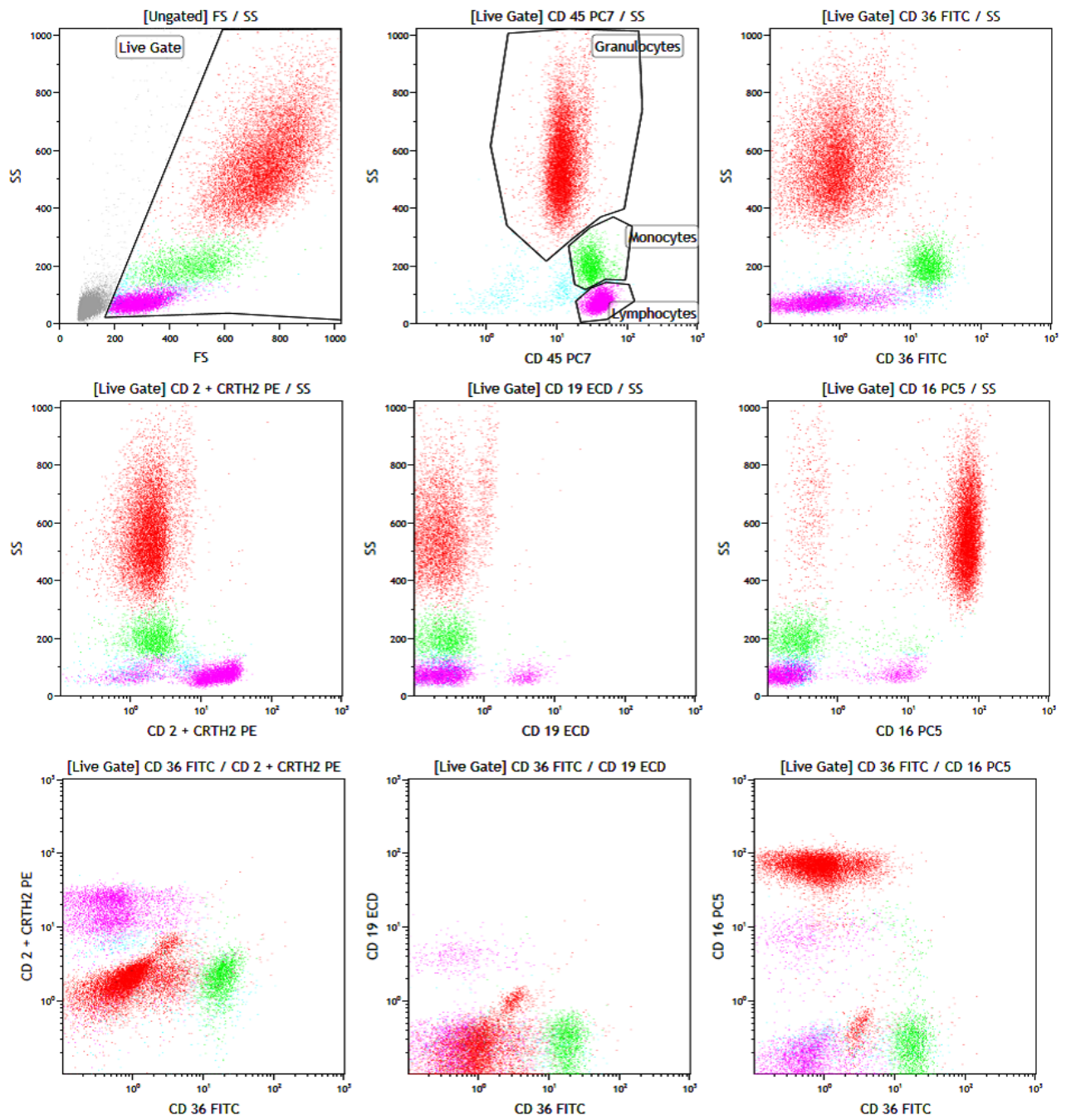


Figure 14 : Exemple d'immunophénotypage par cytométrie en flux

4. Application de l'immunophénotypage étendu des leucocytes au Sepsis

4.1. Intérêt et faisabilité

La cytométrie en flux permet une analyse rapide du profil cellulaire, et ainsi d'étudier l'état de la réponse immunitaire cellulaire à travers l'expression de marqueurs de surface par un immunophénotypage étendu. Cependant, peu de données dans la littérature concernent la faisabilité et l'intérêt de cette plus large analyse des leucocytes circulants chez le patient septique.

De nouvelles techniques de numération utilisant un marquage CD36-FITC/CD2-PE/CD19-ECD/CD16-Cy5/CD45-Cy7 permettent de quantifier de nombreuses sous-populations sanguines circulantes [83]. Suite aux travaux menés en onco-hématologie dans le cadre du diagnostic des leucémies et lymphomes, certaines combinaisons se sont révélées particulièrement informatives [84]. L'histogramme bi-paramétrique CD45/SS sert au ciblage des cellules. L'association CD14/CD71/CD11b/CD16 permet de suivre l'activation et la maturation des lignées monocytaires et granuleuses [85,86,87]. L'association CD64/CD10/CD24/CD45 permet de suivre la maturation granuleuse terminale, et le marqueur CD34 d'apprécier le taux de cellules circulantes les plus immatures par exemple [83].

La caractérisation phénotypique des leucocytes par cytométrie en flux est un outil disponible rapidement, en moins de 3 heures. De plus son utilisation est déjà évaluée et de pratique bien codifiée en hématologie biologique depuis plusieurs années [88].

Dans le domaine du Sepsis, plusieurs études réalisées sur de petits effectifs de patients avec un immunophénotypage leucocytaire restreint tendent à démontrer que la caractérisation de multiples phénotypes leucocytaires pourrait être utile au diagnostic et au pronostic des patients septiques [89].

4.2. Intérêt des marqueurs étudiés

4.2.1. Les polynucléaires neutrophiles

Un des marqueurs le plus étudié dans la littérature est le marqueur de surface CD64 situé essentiellement sur les cellules présentatrices d'antigènes (essentiellement sur les polynucléaires neutrophiles et dans une moindre mesure sur les monocytes et cellules dendritiques) [90,91,92]. Il s'agit d'un fragment du récepteur de haute affinité aux IgG (Fc γ RI). Il fait partie d'une famille de récepteurs situé sur la lignée des cellules myéloïdes (les deux autres étant le CD32 : Fc γ RII et le CD16 : Fc γ RIII). Ils agissent en concert avec les récepteurs du complément pour effectuer le lien entre la réponse immunitaire cellulaire et humorale. Ils permettent ainsi la phagocytose, la clearance des complexes immuns, la présentation d'antigènes et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation. Son expression est régulée par les cytokines pro-inflammatoires (notamment l'IL12 ou l'interféron γ) et le G-CSF.

Une étude réalisée en 2007 sur 135 patients septiques retrouvait une augmentation du nombre de CD64 à la surface des polynucléaires neutrophiles et des monocytes par rapport au groupe de patients contrôle [93]. Néanmoins le nombre de CD64 dans cette étude ne permettait pas de différencier les patients atteints d'une infection bactérienne ou virale ni d'une infection localisée ou généralisée.

Une méta-analyse effectuée en 2010 par Cid [91], montrait que le CD64 était up-régulé sur les polynucléaires neutrophiles activés des patients septiques, et ce pendant les 4 à 6 premières heures du Sepsis avec une normalisation au 7^{ème} jour. La sensibilité et la spécificité de ce marqueur comme outil diagnostique était respectivement de 82% et 92%. Toutefois la plupart des essais inclus étaient de faible puissance méthodologique.

L'intérêt actuel pour ce marqueur se situe essentiellement dans la distinction entre réponse inflammatoire systémique d'origine infectieuse ou non, son expression reflétant l'intensité de la réponse inflammatoire induite par le pathogène [94,95,96].

Par ailleurs plusieurs auteurs se sont attachés à évaluer ce marqueur comme outil pronostique dans le Sepsis. Par exemple, Livatidi [97] a réalisé une étude sur 47 patients septiques avec comme but de trouver des marqueurs biologiques permettant de prédire une évolution défavorable des patients septiques (PCT, CRP, plusieurs interleukines et enfin l'expression du CD64 sur les neutrophiles). Seuls les taux élevés de CD64 et d'IL8 étaient

prédictifs d'une évolution défavorable. Ainsi l'évaluation de l'expression du CD64 pourrait s'avérer être un marqueur diagnostique et pronostique du Sepsis.

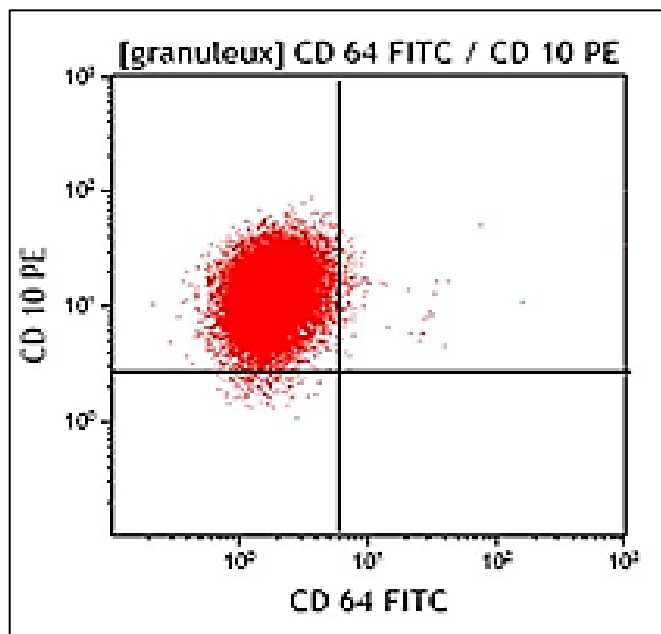


Figure 15 : Immunophénotypage de cellules granuleuses

D'autres marqueurs de surface ont été étudiés dans la littérature dans une moindre mesure. Le CD10, encore appelé endopeptidase ou CALLA, est une métalloprotéinase exprimée à la surface des polynucléaires neutrophiles. Des études animales ont mis en évidence une susceptibilité accrue à l'infection et au choc endotoxinique lorsque l'expression du gène était bloquée [98]. Chez l'homme, la mise en contact avec du matériel bactérien de type *E. Coli* et *S. Aureus* se traduit par une expression moindre de CD10 à la surface des polynucléaires neutrophiles [99]. Ainsi de rares études, essentiellement animales et *in vitro*, tendent à suggérer une diminution de son expression de façon proportionnelle à la gravité du Sepsis [100].

4.2.2. Les monocytes

Autre effecteur de la réponse immunitaire non spécifique, le monocyte est à l'origine de la sécrétion de nombreuses cytokines régulant la réponse immunitaire et l'inflammation. Williams a observé une augmentation de l'apoptose sur les monocytes circulants du patient

septique [101], et ce d'autant plus que ces patients allaient décéder du Sepsis [102]. Là encore plusieurs marqueurs de surface ont été étudiés dans la littérature ces dernières années.

La cytométrie en flux permet de différencier plusieurs sous-populations monocytaires, notamment les monocytes dits inflammatoires (CD14+ CD16+) et les monocytes non inflammatoires (CD14+ CD16-) [103]. Le récepteur CD16 est un récepteur de faible affinité exprimé à la surface de nombreuses cellules immunitaires et notamment au niveau des monocytes [104]. Il permet la reconnaissance du pathogène puis sa phagocytose. La sous population CD16+ dite pro-inflammatoire (avec une sécrétion accrue de $TNF\alpha$, une capacité plus marquée à la présentation antigénique avec des taux de CMHII plus élevés) représente environ 10% des monocytes. Cette population semble être augmentée chez les patients atteints d'un processus infectieux.

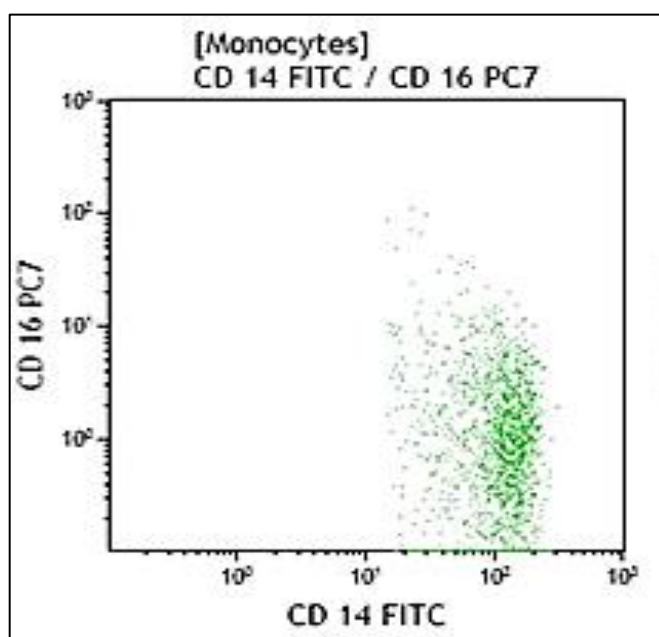


Figure 16 : Immunophénotypage de cellules monocytaires

Le CD40 est un récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs du $TNF\alpha$. Il est un médiateur du facteur tissulaire, de cytokines (IL-1, IL-6, IL-10), de métalloprotéinase et d'oxyde nitrique. Son expression semble accrue dans le sepsis. Par ailleurs son taux s'avère être potentiellement corrélé à la survie des patients septiques d'autant plus que les patients sont bactériémiques. Une étude réalisée sur un petit effectif de patients en Sepsis sévère montrait une diminution de l'expression du CD40 chez les patients non survivants [105].

4.2.3. Les lymphocytes

Le Sepsis se caractérise par une lymphopénie marquée dès les premières heures contrairement aux neutrophiles et monocytes. Cette lymphopénie est corrélée avec un pronostic défavorable des patients septiques.

Les sous-populations lymphocytaires T sont connues pour involuer lors du Sepsis, reflétant un processus d'apoptose globalement corrélé à la sévérité du Sepsis, conformément aux travaux publiés par Hotchkiss à partir de séries autopsiques de patients décédés d'infection [106,107]. Toutes les sous populations lymphocytaires semblent être touchées par l'apoptose [108].

De plus il semblerait que le degré d'apoptose soit un marqueur pronostique important, se traduisant en cas de survie par un état d'anergie expliquant la fréquence des infections nosocomiales à distance de l'épisode aigu [18]. En effet Le Tulzo [109] a comparé en 2002, le taux de lymphocytes apoptotiques chez des patients en choc septique et des patients victimes d'un Sepsis mais sans état de choc. Il apparaissait ainsi dans cette étude un taux plus élevé de lymphocytes apoptotiques et une persistance de ceux-ci au 7^{ème} jour chez les patients en choc septique non survivants.

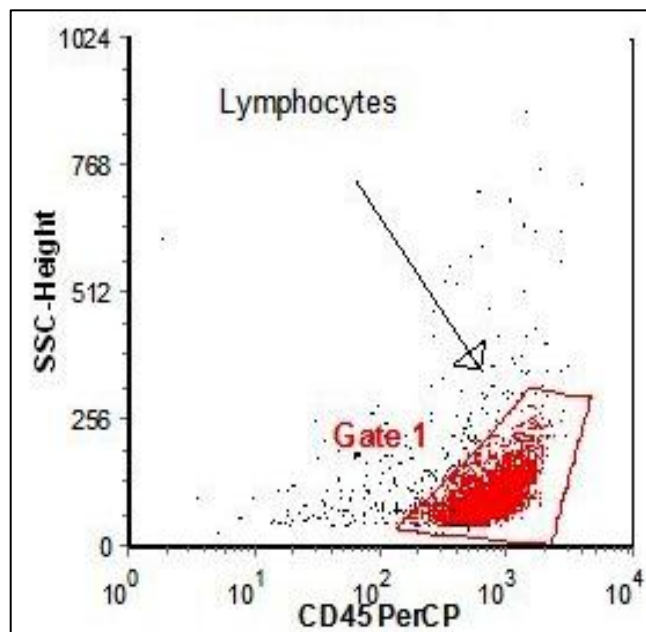


Figure 17 : Immunophénotypage de cellules lymphocytaires

4.2.4. *Les cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques sont reconnues pour être des sentinelles de la réponse immunitaire. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes jouant un rôle majeur dans l'initiation et la modulation de la réponse innée et adaptative : elles stimulent les cellules T et leur différenciation en Th1 ou Th2, et les cellules B [110]. Elles pourraient persister des années pour maintenir la mémoire immunitaire [111].

Il existe deux types de cellules dendritiques :

- Les dendrites myéloïdes (orientant plutôt vers une réponse de type Th1)
- Les dendrites plasmacytoïdes (orientant plutôt vers une réponse de type Th2).

Ces deux populations expriment ainsi différents marqueurs de surface.

Les cellules dendritiques sont connues pour diminuer au cours du Sepsis par des mécanismes d'apoptose induisant un état d'anergie des cellules immunitaires et une véritable situation d'immunosuppression [110].

Guisset a démontré une diminution drastique des cellules dendritiques circulantes dès la 12^{ème} heure chez les patients en choc septique [59]. De nombreuses autres études, réalisées là encore sur de petits effectifs de patients, ont suivi et ont retrouvé des résultats similaires [112,68].

Parallèlement le taux de cellules dendritiques apparaît être un facteur pronostique dans le Sepsis. En effet un taux plus bas de cellules dendritiques semble être présent chez les patients ne survivant pas à un processus infectieux [59].

4.3. Perspectives d'avenir

La plupart des études précédentes dans la littérature, portant sur l'immunophénotypage dans le Sepsis, ont été réalisées sur de petits effectifs de patients. De plus l'immunophénotypage des cellules immunitaires était dans la plupart des études restreint et ne concernait ainsi qu'un type de cellules de l'immunité innée ou acquise.

De ce fait une étude effectuée sur un plus large échantillon de population avec un immunophénotypage étendu à toutes les cellules immunitaires pourrait être utile au clinicien dans l'évaluation et le diagnostic du Sepsis en pratique courante.

Par ailleurs d'autres perspectives peuvent être envisagées, notamment au plan de la recherche clinique et au plan thérapeutique, essentiellement en termes d'immunothérapie

[113]. Ainsi la caractérisation des phénotypes leucocytaires permettrait de différencier les différentes phases inflammatoires chez un patient septique (hyperinflammation ou immunosuppression) et de ce fait d'instaurer des thérapeutiques immunologiques appropriées à chaque malade [114,115,116].

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'intérêt diagnostique et pronostique d'un immunophénotypage leucocytaire étendu par cytométrie en flux multiparamétrique à la phase aigüe du Sepsis ainsi que sa faisabilité et sa reproductivité dans une pratique clinique quotidienne.

PATIENTS ET METHODES

1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude monocentrique, se déroulant dans le centre hospitalier universitaire de Limoges, prospective portant sur des patients consécutifs admis aux urgences ou en réanimation pour un Sepsis d'avril 2010 à juin 2011.

2. Population étudiée

2.1. Critères d'inclusion

Tous les patients majeurs, admis aux Urgences ou en Réanimation ayant au moins deux critères de SIRS et suspects d'infection évolutive, étaient potentiellement éligibles à une inclusion dans l'étude septiflux. Ces patients étaient recrutés à partir d'une liste de pré-screening produite automatiquement par informatique à partir de la conclusion médicale de la prise en charge initiale à l'admission à l'hôpital, en fonction des codes infectiologiques de la CIM 10.

L'éligibilité définitive était vérifiée par un médecin après confirmation du Sepsis par examen du dossier médical et contact avec l'équipe médicale en charge du patient au plus tard le lendemain de l'admission du patient. Les patients présentant deux critères de SIRS mais des données cliniques et biologiques initiales peu en faveur d'une infection évolutive n'étaient pas retenus dans l'étude.

Par la suite les données cliniques, biologiques et bactériologiques à l'admission étaient collectées dans un cahier d'observation par un technicien de recherche clinique chaque jour d'hospitalisation et ce pendant 7 jours consécutifs.

A noter que la prise en charge médicale et thérapeutique du patient étaient laissées à la discrétion du praticien en charge du patient.

2.2. Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion étaient :

- La grossesse
- Un âge inférieur à 18 ans
- L'absence d'affiliation à un régime de sécurité sociale
- Un cancer solide évolutif
- Une infection à VIH
- Un antécédent de maladie hématologique ou inflammatoire
- Un traitement par immunosuppresseur au long cours
- Une altération des facultés de jugement

3. Méthodes

3.1. Caractéristiques des patients

Pour chaque patient inclus, les données suivantes étaient colligées par un attaché de recherche clinique à partir du dossier médical et paramédical :

3.1.1. Données cliniques et biologiques recueillies à l'admission :

- L'âge
- Le sexe
- Le poids
- La taille
- Le motif d'admission aux urgences ou en réanimation
- Le statut médical ou chirurgical
- Les critères de SIRS
- Les potentielles dysfonctions d'organes
- Le score SOFA au 1^{er} jour
- Les dosages initiaux de la CRP et de la PCT

3.1.2. Données bactériologiques recueillies à l'admission et jusqu'au 7^{ème} jour :

Le nombre et le type de prélèvements bactériologiques étaient décidés par le ou les médecins en charge du patient. Les données recueillies étaient :

- Le caractère communautaire ou nosocomial de l'infection
- L'origine des prélèvements bactériologiques
- Les dates des prélèvements
- La classe des germes retrouvés
- Le nom des germes retrouvés

3.1.3. Profil évolutif des patients à 48h, 72h et jusqu'au 7^{ème} jour

- Les critères de SRIS jusqu'à leur disparition ou jusqu'au 7^{ème} jour
- Le SOFA au 2^{ème} et 3^{ème} jour
- Le dosage de la PCT au 2^{ème} et 3^{ème} jour
- Les défaillances d'organes jusqu'à leur disparition ou jusqu'au 7^{ème} jour
- La date de sortie de l'hôpital si elle se réalisait avant le 7^{ème} jour
- La date de décès si il survenait avant le 7^{ème} jour

3.2. Revue du dossier des patients : codage

Afin d'uniformiser et de classer de façon homogène les patients inclus dans l'étude Septiflux, les dossiers médicaux étaient revus et codés à postériori par deux médecin experts indépendants. Les patients étaient classés en fonction d'un groupe diagnostique, de leur processus infectieux et de leur évolutivité pendant 7 jours. Après un examen du recueil de données, les patients ne présentant pas d'évidence (clinique, biologique ou bactériologique) d'infection, étaient alors exclus de l'étude.

3.2.1. Groupes diagnostiques à l'inclusion :

Les patients étaient répartis ainsi en 3 groupes selon la conférence de consensus internationale de 2001 [1] :

- Sepsis : groupe A
- Sepsis sévère : groupe B
- Choc septique : groupe C

Les défaillances d'organes nécessaires à la stratification diagnostique des patients étaient prises en compte jusqu'à 2 heures après leur inclusion dans l'étude.

3.2.2. Le processus infectieux

A partir du recueil de données, l'infection était considérée comme communautaire ou nosocomiale. La présence ou non d'une bactériémie était notée. De la même façon le site de l'infection, le type et le nom du ou des germes étaient relevés pour chaque patient.

Un niveau d'évidence d'infection était attribué à chaque patient selon les définitions de 2005 [117] :

➤ Infection pulmonaire

- Certaine : présence d'un infiltrat radiologique nouveau ou extensif et d'une forte suspicion clinique, associés à une preuve biologique : hémoculture, liquide pleural, ponction d'abcès, pathogènes dans les sécrétions, Lavage Broncho Alvéolaire $> 10^4$ CFU/ml (LBA) ou mini LBA $> 10^3$ CFU/ml ou brosse distale protégée $> 10^3$ CFU/ml, antigénurie légionelle ou pneumocoque, conversion sérologique (X4), PCR positive, antigène aspergillaire positif.

- Probable : présence d'un infiltrat radiologique nouveau ou extensif et d'une suspicion clinique élevée, associés à une preuve biologique : pathogène à l'examen direct ou culture positive dans les sécrétions (expectorations, aspiration endotrachéale ou bronchoscopique, LBA ou brosse sans les critères requis de certitude), ou sans preuve microbiologique mais une PCT > 0.5 ng/ml.

- Possible : radiographie anormale avec une suspicion clinique faible à modérée mais avec une évidence microbiologique ou sérologique, ou une PCT > 0.25 ng/ml.

➤ Infection Intra-Abdominale

- Certaine : présentation clinique compatible, avec une preuve microbiologique dont une hémoculture positive ou une ascite infectée (plus de 500 leucocytes/ml avec prédominance de polynucléaires neutrophiles, avec $\text{pH} < 7,35$ ou une concentration en acide lactique dans l'ascite $> 2,5 \text{ mg/l}$).
- Probable : présentation clinique compatible, avec un examen direct positif mais des cultures négatives, ou une ascite infectée (inflammatoire, $\text{pH} < 7,35$ sans les critères sus-cités), ou une évidence chirurgicale ou radiologique de perforation.
- Possible : présentation clinique compatible sans culture ni examen direct positif.

➤ Infection urinaire

- Certaine : hémoculture positive, évidence peropératoire, ou pyurie avec une uroculture positive $> 10^5 \text{ CFU/ml}$ ($> 10^3 \text{ CFU/ml}$ si sondage).
- Probable : présentation clinique compatible associée à une uroculture positive ou des bactéries à l'examen direct. Sont incluses dans infection probable les preuves radiologiques et échographiques d'infection.
- Possible : présentation clinique compatible avec une pyurie sans uroculture ou examen direct positif.

➤ Infection cutanée et des tissus mous

- Certaine : culture ou gram positif sur du pus ou une biopsie sous-cutanée d'une lésion érythémateuse.
- Probable : présentation clinique et biologique (érythème, pus, lymphangite, fièvre, hyperleucocytose) compatible ou présence d'une preuve chirurgicale ou radiologique mais sans preuve microbiologique.
- Possible : absence des critères précédents.

➤ Infections autres

- Certaine : identification d'un pathogène par culture ou PCR sur un prélèvement normalement stérile, entre 48 h avant et 48h après le diagnostic de sepsis.
- Probable : $\text{PCT} > 0,5 \text{ ng/ml}$.

- Possible : PCT > 0,25 ng/ml.

3.2.3. Profil évolutif des patients durant le suivi

Un profil évolutif précoce, correspondant à un éventuel premier changement de groupe, était donné à chaque patient au cours du suivi et ce pendant 7 jours, au vu du nombre cumulé de défaillances d'organes :

- Amélioration : par exemple passage du groupe B au groupe A
- Dégradation : par exemple passage du groupe B au groupe C
- Stabilité

Par ailleurs au 7^{ème} jour, était notée la situation du patient :

- Vivant
- Guéri
- Mort du sepsis
- Mort d'une cause non infectieuse

3.3. Modalités de l'immunophénotypage leucocytaire

3.3.1. Echantillon sanguin, anticorps et cytométrie en flux

La numération des différentes populations leucocytaires par cytométrie en flux était réalisée sur un résidu de tube à numération de la formule sanguine (NFS) standard (EDTA, 250 µl), prélevé lors de l'admission du patient à l'hôpital, à 24 heures et à 48 heures. Par ailleurs, pour les patients les plus graves (patients faisant parti du groupe choc septique ou se dégradant dans les 24 premières heures), 2 autres NFS étaient réalisées le 1^{er} jour de l'inclusion. Chaque tube était transporté à température ambiante au laboratoire d'hématologie. Il était analysé au maximum dans les 24 heures après le prélèvement (en moyenne 4 heures).

Les normales de cytométrie en flux ont été établies sur la même période à partir de 50 patients contrôles, volontaires sains. Ces témoins étaient recrutés lors du bilan biologique pré-anesthésique de chirurgie potentiellement hémorragique.

Une numération complète de la formule sanguine était réalisée grâce à un analyseur d'hématologie : Advia2120i (Siemens) ou Cell Dyn Sapphire (Abott). Deux frottis sanguins étaient effectués pour chaque échantillon.

Quatre combinaisons ont été testées en 5 couleurs (FITC, PE, ECD, PECy5 et PECy7)

- CD36/CD2+CRTH2/CD19/CD16/CD45: Tube 1, combinaison commercialisée par Beckman Coulter sous le nom de Cytodiff.

- CD14/CD11c/CD45/CD11b/CD16: Tube 2

- CD64/CD10/CD45/CD24/CD34: Tube 3

- CD116/CD123/CD45/CD138/CD4: Tube 4

Une combinaison a été testée en 10 couleurs (FITC, PE, ECD, PE Cy5.5, PE Cy7, APC, APC A700, APC A750, PB, KO)

- CD4/DR/CD8/CD38/CD25/CD56/CD127/CD3/CD16/CD45: Tube 5

Un total de 39 sous populations sanguines circulantes était potentiellement identifiable et caractérisées selon la littérature. L'immunomarquage direct était réalisé sur 40 ml de sang total ou dilué pour obtenir une concentration inférieure à 10 G/l. Après incubation pendant 15 minutes dans le noir, à température ambiante, les érythrocytes étaient lysés avec des agents enzymatiques versalyse (Beckman Coulter) selon les instructions du constructeur. Le tube était ensuite passé dans le cytomètre.

L'analyseur était un cytomètre en flux FC500 de Beckman Coulter pour les 5 couleurs et sur un Navios Beckman Coulter pour les 10 couleurs. L'analyse était réalisée après l'acquisition d'au moins 75 000 évènements.



Figure 18 : Cytomètre en flux Beckman Coulter

Le réglage des photomultiplicateurs était effectué avec des billes de calibration de fluorescence (flow-set fluorospheres ; Beckman Coulter) selon les recommandations du constructeur pour la correction des variations de puissance du laser. La compensation était faite en utilisant une technique de calibration automatique (Advanced Digital Compensation de Beckman Coulter) selon le protocole du fournisseur.

Les résultats sont exprimés en pourcentage et intensité moyenne de fluorescence. Le compte absolu des différentes sous-populations leucocytaires était calculé à partir du nombre total de leucocytes.

3.3.2. Stratégie de « gating »

La stratégie de gating était basée sur 2 types de gates différents : les gates dites d'orientation et les gates dites spécifiques. La première permettait de présélectionner progressivement les populations d'intérêt, la deuxième correspondait aux cellules ciblées présumées. Une des premières étapes consistait en l'élimination des débris cellulaires sur le SSC/FSC.

Par exemple pour isoler les granulocytes CD10-, la combinaison CD10/CD24/CD34/CD64/CD45 était utilisée. La première gate d'orientation était défini sur l'histogramme biparamétrique CD45/SSC, ciblant ainsi les leucocytes totaux. Le second histogramme CD45/SSC permet de définir une gate spécifique pour les granulocytes. Le troisième histogramme CD10/CD24 permet d'éliminer les éosinophiles et d'isoler les granulocytes neutrophiles. Parmi les granulocytes neutrophiles, la gate dit d'intérêt était porté sur les granulocytes CD10- (figure 19).

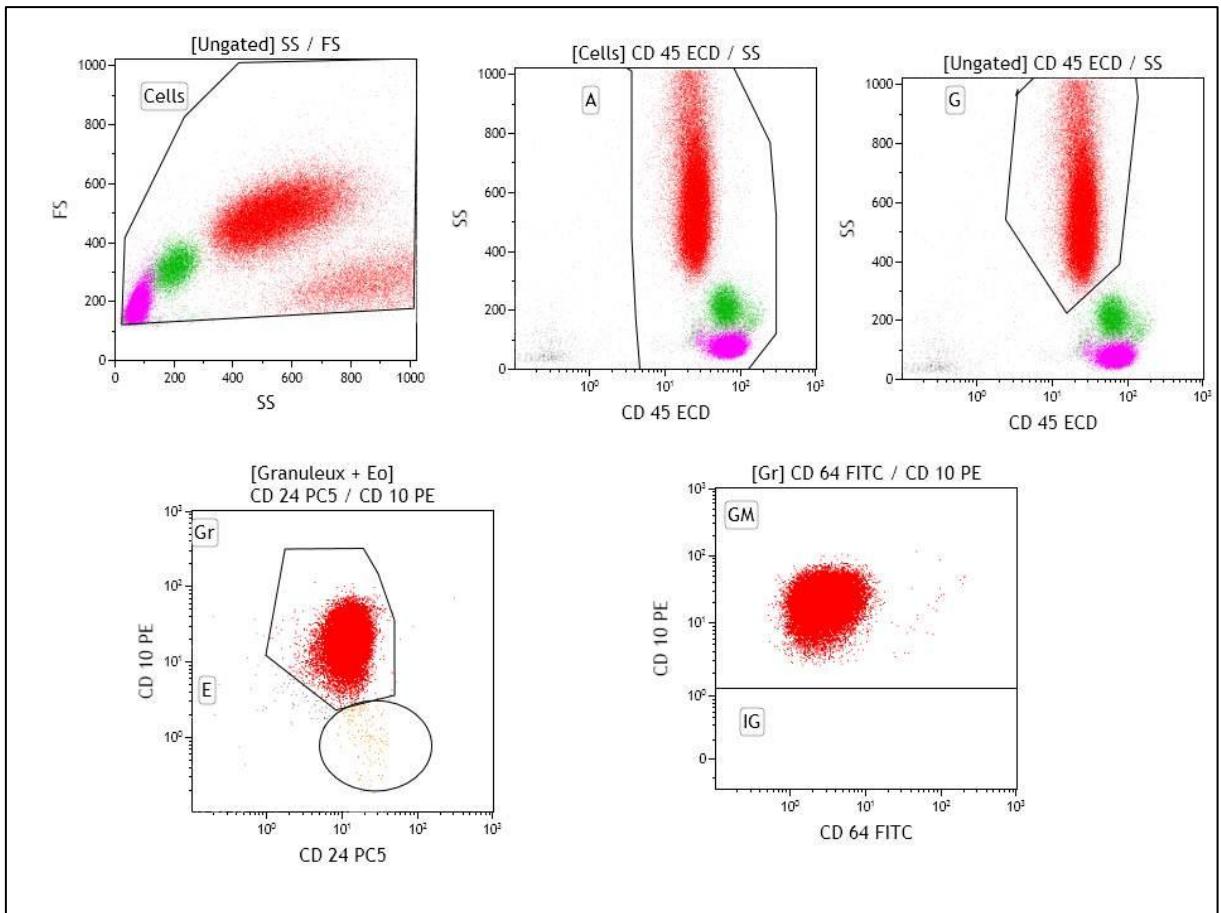


Figure 19 : Exemple d'une stratégie de gating isolant les granuleux CD10- pour un témoin

4. Méthodes statistiques

4.1. Analyse descriptive

Les groupes de patients (A, B et C) à l'inclusion sont comparés au moyen de statistiques descriptives usuelles.

Les variables qualitatives sont décrites par leurs effectifs et pourcentages. Elles sont comparées à l'aide du test du Chi 2 ou du test exact de Fisher.

Les variables quantitatives sont décrites par leurs moyennes et écart-types. En cas de variables à comportement asymétrique, elles sont présentées avec leurs médianes et intervalles interquartiles. Elles sont comparées à l'aide d'une ANOVA ou du test de Kruskal Wallis.

4.2. Analyse des paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques sont comparés à l'aide du test de Wilcoxon pour la comparaison patients contre témoins et l'évolution précoce, et à l'aide du test de Kruskal Wallis pour les groupes diagnostiques et l'évolution au 7^{ème} jour.

5. Aspects réglementaires et financiers

Cette étude de type « soins courants », a été réalisée dans le cadre d'un appel à projet Recherche Translationnelle INSERM/DGOS.

Une subvention complémentaire du conseil régional a permis la réalisation du projet.

Le laboratoire Beckman Coulter a mis à disposition un automate.

L'accord du CCTIRS a été obtenu.

6. Aspects éthiques

Un avis favorable a été obtenu auprès du comité d'éthique local. Cette étude prospective observationnelle ne nécessitait pas de conservation de matériel biologique. Une notice d'information était remise au patient après accord sans nécessité de consentement écrit, conformément aux lois de bioéthiques en vigueur.

Pour tous les patients inclus, la non opposition à la réalisation de l'étude a été obtenu par le biais du document institutionnel, relatif aux droits des patients.

RESULTATS

1. Schéma de l'étude

D'avril 2010 à mai 2011, 184 patients ont été inclus dans l'étude septiflux. Parmi ces 184 patients, 6 patients ont été exclus à posteriori devant l'absence d'évidence clinique ou microbiologique d'infection. Un immunophénotypage leucocytaire complet a pu être réalisé pour 171 patients.

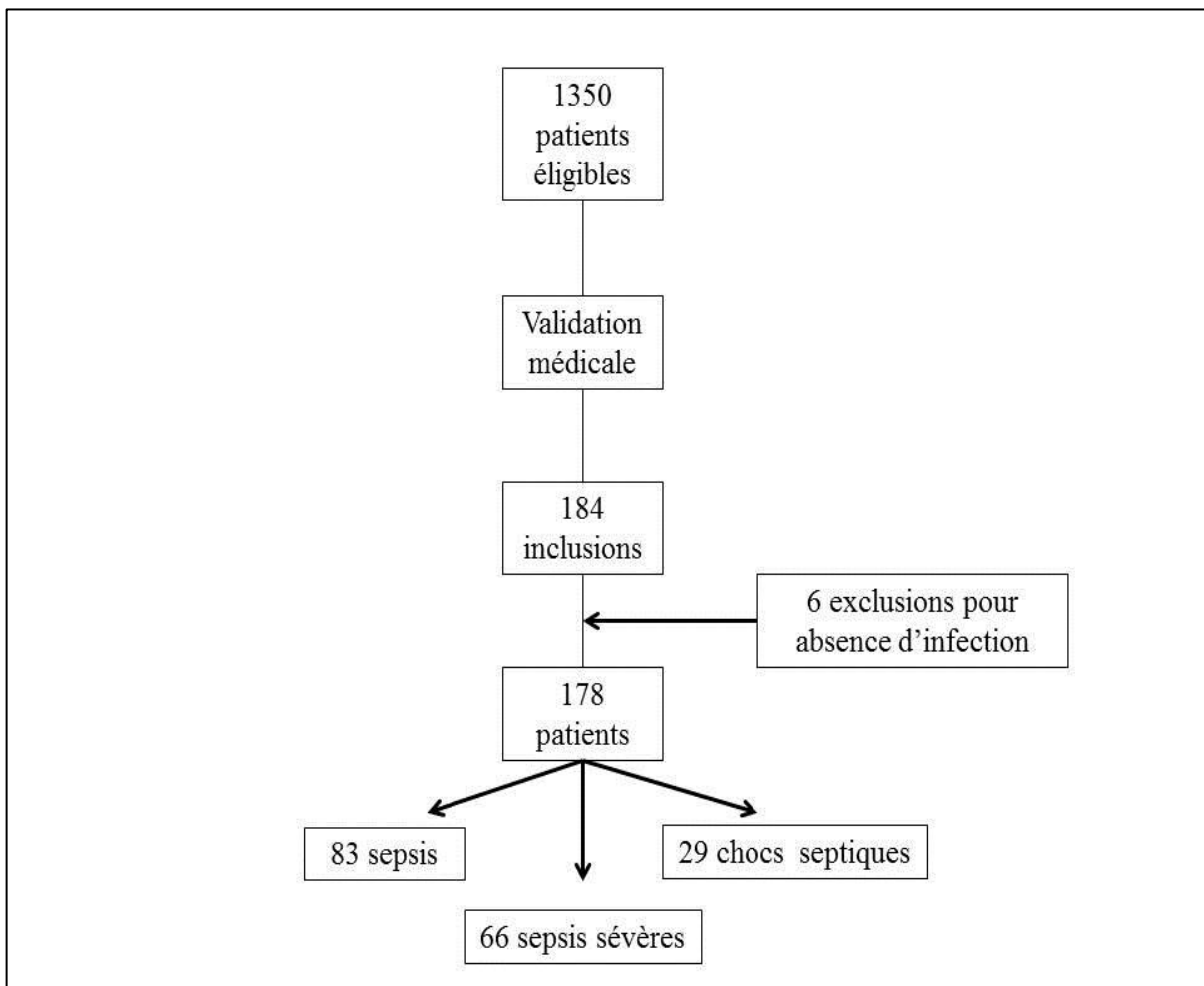


Figure 20 : "Consort" de l'étude

2. Caractéristiques de la population

2.1. Population générale

2.1.1. Données épidémiologiques et biologiques

La population étudiée était constituée de 102 hommes (57,3%) et 76 femmes (42,7%). L'âge moyen des patients était de 60 +/- 19 ans. Le motif d'admission aux urgences ou en réanimation était médical chez 131 patients (73,6%) et chirurgical chez 47 patients (26,4%). Le score SOFA médian à l'inclusion était de 2 [1 ; 7].

La défaillance la plus fréquente, quel que soit le stade de gravité à l'inclusion, était la défaillance métabolique (près de 40% des patients) suivie d'une défaillance respiratoire et circulatoire (respectivement 33,7% et 17,4% des patients).

Concernant les variables biologiques à l'inclusion, le taux médian de la CRP était à 191 mg/ml [79 ; 316] et celui de la PCT à 4,4 ng/ml [1,1 ; 24,3].

De façon générale, 43 patients (soit 24,2% de la population) se dégradèrent et les autres 135 patients restaient stables ou s'améliorèrent de façon précoce. Au total 15 patients étaient décédés au 7^{ème} jour quel que soit leur stade à l'inclusion soit un taux global de mortalité à 8,4% (tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques globales de la population

Caractéristiques	Population globale
Age (année), moy +/- et	60 +/- 19
Sexe F, n (%)	76 (42,7)
Statut, n (%)	
Médical	131 (73,6)
Chirurgical	45 (25,3)
Traumatologie	2 (1,1)
CRP (mg/ml), med [Q1 ; Q3]	191 [79 ; 316]
PCT (ng/ml), med [Q1 ; Q3]	4,4 [1,1 ; 24,3]
SOFA, med [Q1 ; Q3]	2 [1 ; 7]
Nombre de défaillance, n (%)	
0	83 (46,6%)
1	44 (24,7%)
2	28 (15,7%)
3	16 (9%)
4	5 (2,8%)
5	2 (1,1%)
Type de défaillance, n (%)	
Respiratoire	60 (33,7%)
Rénale	3 (1,7%)
Hématologique	10 (5,6%)
Métabolique	72 (40,4%)
Circulatoire	31 (17,4%)
Sans vasopresseurs	4 (2,2%)
Avec vasopresseurs	27 (15,2%)
Evolution précoce	
Dégradation, n (%)	43 (24,2%)
Amélioration, n (%)	135 (85,8%)
Décès, n (%)	
Cause infectieuse	11 (6,2)
Cause non infectieuse	4 (2,2)

2.1.2. Données bactériologiques

L'origine du processus infectieux était majoritairement communautaire (158 patients soit 89,3%). Le site de l'infection était pulmonaire dans 28% des cas, abdomino-pelvien dans 24,7% des cas, génito-urinaire dans 23,6% des cas et cutané dans 11,2% des cas (figure 21).

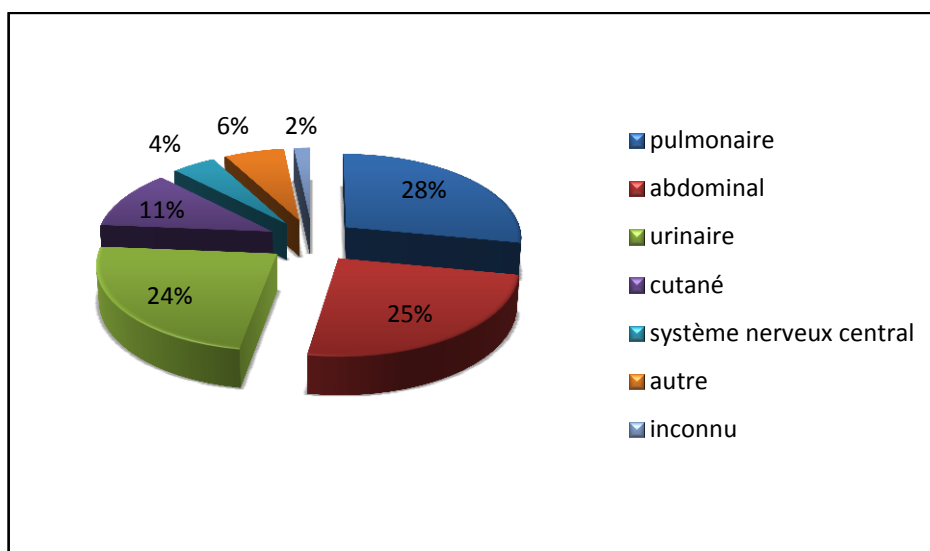


Figure 21 : Sites infectés dans la population globale

Une preuve bactériologique a été obtenue pour 112 patients (soit 62,9% des patients suspects de développer un processus infectieux). De plus le niveau d'évidence du Sepsis était certain ou probable dans près de 85% des cas (figure 22).

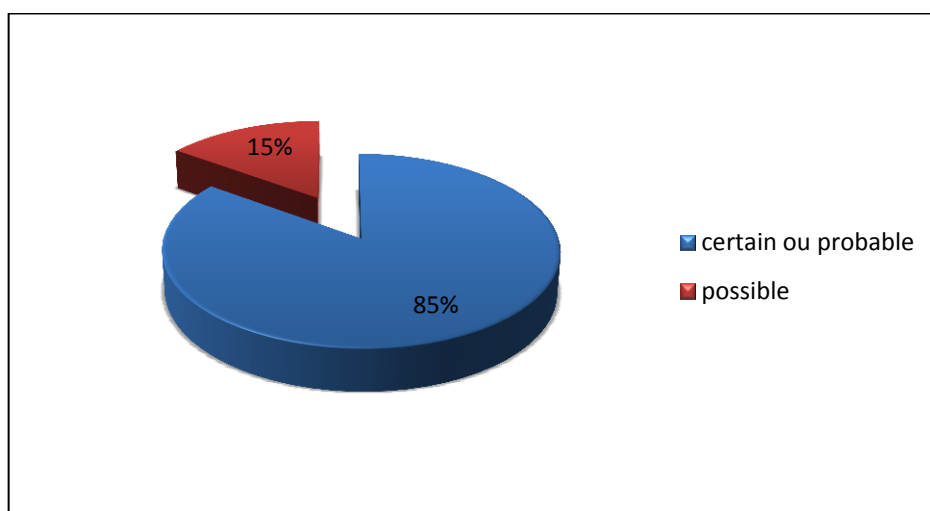


Figure 22 : Niveau d'évidence de l'infection

Les germes en cause (figure 23) étaient majoritairement des Grams négatifs (environ 54% des patients) et des Grams positifs (environ 31% des patients).

Un quart des patients à l'inclusion étaient bactériémiques quel que soit le niveau de gravité.

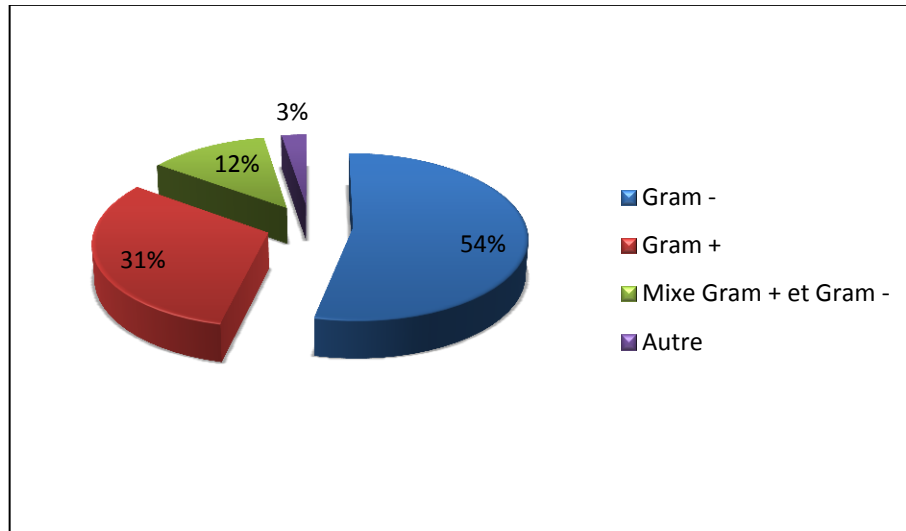


Figure 23 : Gram des germes dans la population globale

Parmi les germes en cause (figure 24) on notait une nette prédominance du germe *E. Coli* (38,3% des cas) suivi du *S. Pneumoniae* (13,4% des patients).

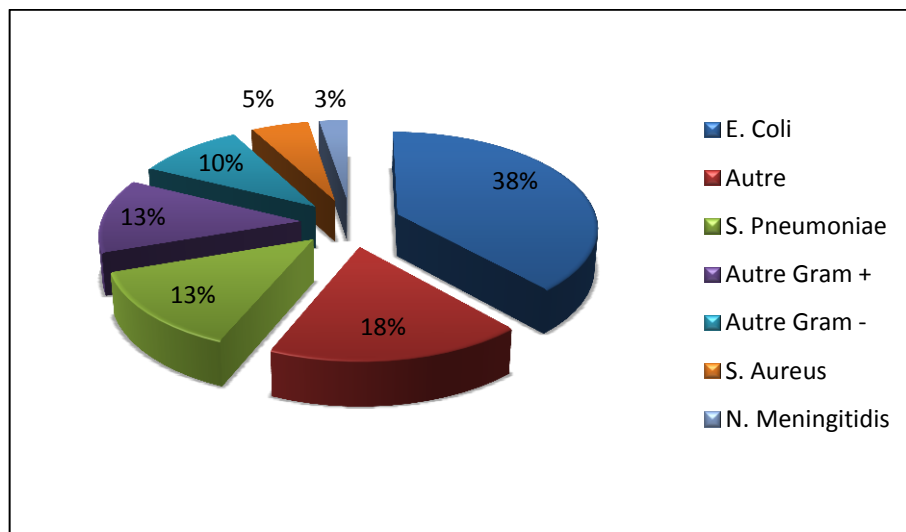


Figure 24 : Typage des germes dans la population globale

2.2. Comparaison des groupes à l'inclusion

2.2.1. Données épidémiologiques et biologiques

Le sexe masculin prédominait chez les patients septiques et ce d'autant plus si le Sepsis était grave (47% dans le groupe Sepsis, 63,6% dans le groupe Sepsis sévère et 73,4% dans le groupe choc septique). Le statut médical des patients était plus fréquent mais cette différence s'amenuisait dans les groupes Sepsis sévère (68,2%) et choc septique (48,3%). Le score SOFA était, de manière non surprenante, croissant selon la gravité des patients (1 dans le groupe Sepsis, 3 dans le groupe Sepsis sévère et 8 dans le choc septique).

Les défaillances d'organes là aussi étaient croissantes selon la gravité des patients. La majorité des patients en Sepsis sévère présentait 1 voire 2 défaillances (66,7% et 30,3% des patients respectivement). La moitié des patients victimes d'un choc septique présentait au moins 3 défaillances d'organes. Là encore les défaillances les plus communes étaient respiratoire (surtout dans le groupe choc septique) et métabolique (71,2% des patients en Sepsis sévère et 86,2% des patients en choc septique). Bien sûr les patients en choc présentaient tous à l'inclusion une défaillance hémodynamique. La survie était de plus en plus faible selon la gravité des patients (100% dans le groupe Sepsis contre 65,5% dans le groupe choc septique).

Le taux sanguin de la CRP n'était pas statistiquement différent entre les 3 groupes. Par contre, on notait une différence significative dans le dosage de la PCT à l'inclusion des patients (respectivement 1,6 ng/ml dans le groupe Sepsis, 8,8 ng/ml dans le groupe Sepsis sévère et 19 ng/ml dans le groupe choc septique) (figure 25, tableau 2).

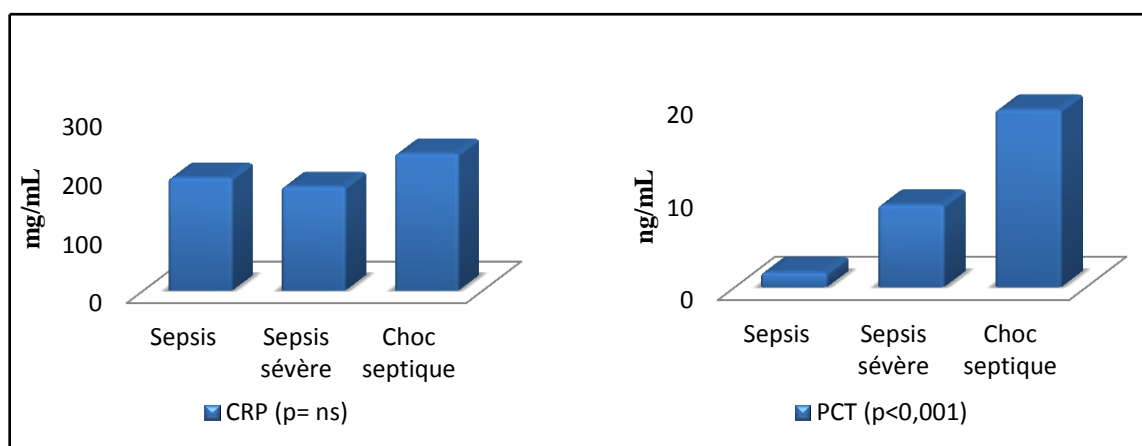


Figure 25 : Dosage de la CRP et de la PCT

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et biologiques des groupes à l'inclusion

Caractéristiques	Sepsis (n = 83)	Sepsis sévère (n = 66)	Choc septique (n = 29)	p
Age (année), moy +/- et	57 +/- 22	62 +/- 17	63 +/- 14	0,151
Sexe F, n (%)	44 (53)	24 (36 ,4)	8 (27,6)	0,025
Statut, n (%)				< 0,001
Médical	72 (86,7)	45 (68,2)	14 (48,3)	
Chirurgical traumatologie	11 (13,3) 0 (0)	20 (30,3) 1 (1,5)	14 (48,3) 1 (3,4)	
SOFA, med [Q1 :Q3]	1 [0 :2]	3 [2 :7]	8 [7 :11]	<0,001
CRP (mg/ml), med [Q1 :Q3]	191 [88 :279]	176 [51 :363]	232 [96 :313]	0,781
PCT (ng/ml), med [Q1 :Q3]	1,6 [0,3 :8,3]	8,8 [1,8 :37,8]	19 [8,4 : 72,5]	<0,001
Nombre de défaillance, n (%)				<0,001
0	83 (100)	0 (0)	0 (0)	
1	0 (0)	44 (66,7)	0 (0)	
2	0 (0)	20 (30,3)	8 (27,6)	
3	0 (0)	2 (3)	14 (48,3)	
4	0 (0)	0 (0)	5 (17,2)	
5	0 (0)	0 (0)	2 (6,9)	
Type de défaillance, n (%)				
Respiratoire	0 (0)	37 (56)	23 (79,3)	
Rénale	0 (0)	1 (1,5)	2 (6,9)	
Hématologique	0 (0)	4 (6,1)	6 (20,7)	
Métabolique	0 (0)	47 (71,2)	25 (86,2)	
Circulatoire				
Sans vasopresseurs	0 (0)	0 (0)	4 (13,8)	
Avec vasopresseurs	0 (0)	0 (0)	27 (93,1)	
Décès, n (%)	0 (0)	5 (7,6)	10 (34,5)	<0,001

2.2.2. Données bactériologiques

L'origine du processus infectieux était majoritairement communautaire quel que soit le groupe d'inclusion. Néanmoins cette prédominance devenait moins nette dans les groupes les plus graves (origine nosocomiale chez 9,2% des patients en Sepsis sévère et 37,9% des patients en choc septique) (figure 26). De la même façon on constatait une prédominance des infections intra abdominale chez les patients en choc septique (16,9% dans le groupe Sepsis contre 37,9% dans le groupe choc septique).

L'obtention d'une preuve bactériologique était croissante selon la gravité du Sepsis (54,2% dans le groupe Sepsis, 62,1% dans le groupe Sepsis sévère et 78,6% dans le groupe choc septique).

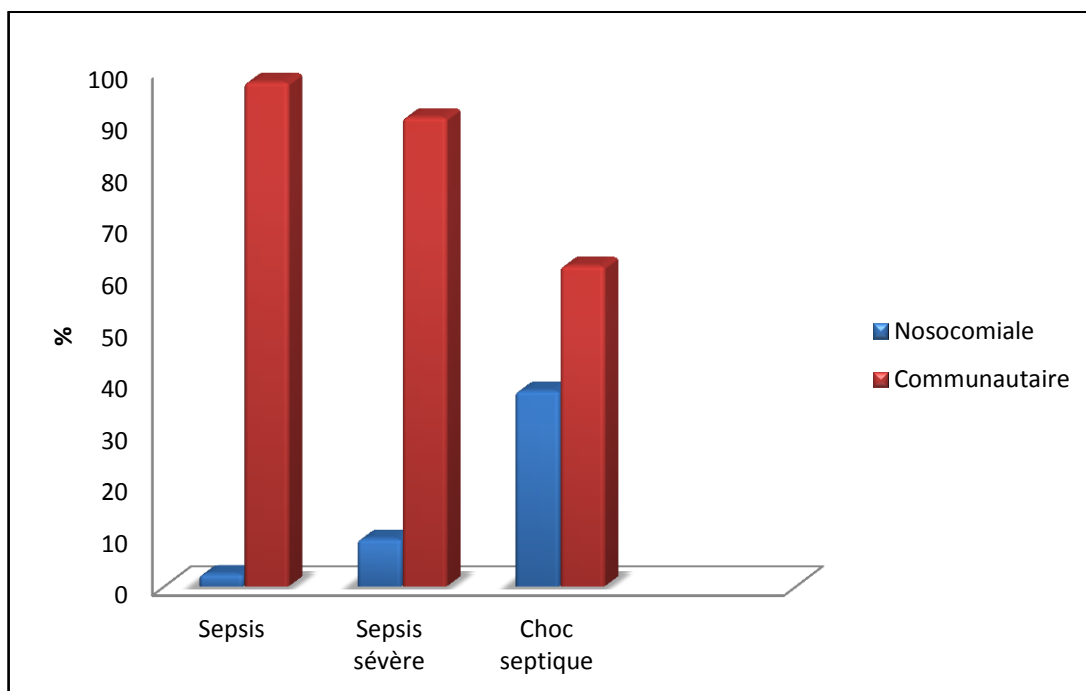


Figure 26 : Origine de l'infection selon les groupes à l'inclusion (p<0,001)

De la même façon plus les patients étaient graves, plus le niveau d'évidence du processus infectieux était certain (49,4% des patients en Sepsis contre 82,8% des patients en choc septique) (figure 27).

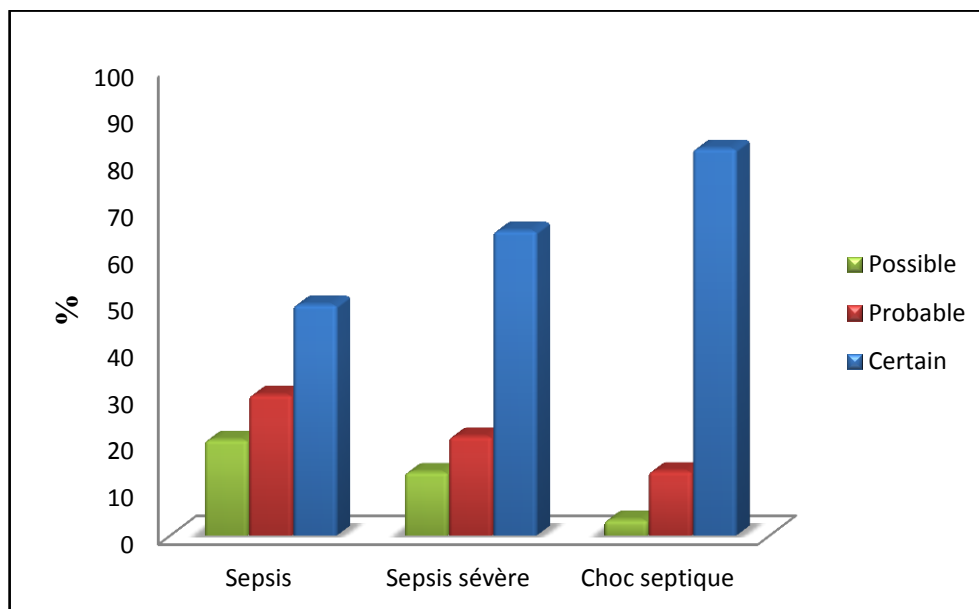


Figure 27 : Niveau d'évidence de l'infection selon les groupes (p = 0,024)

Les germes en cause étaient le plus souvent des grams -, surtout dans le groupe Sepsis ou le germe *E. Coli* prédominait largement (58,7% des patients étaient infectés à ce germe) et dans le groupe choc septique où là encore le germe *E. Coli* et d'autres grams - étaient préférentiellement retrouvés. Dans le groupe Sepsis sévère, le *pneumocoque* était mis en évidence chez environ 20% des patients, de façon concomitante à une proportion plus importante d'infection et d'atteinte pulmonaire.

De plus on constatait une proportion significativement plus importante de patients bactériémiques (essentiellement secondaire) dans les groupes d'inclusion les plus sévères (16,9% des Sepsis, 28,8% des Sepsis sévères et 44,8% des chocs septiques) (tableau 3).

Tableau 3 : Données bactériologiques des différents groupes à l'inclusion

Caractéristiques	Sepsis (n=83)	Sepsis sévère (n=66)	Choc septique (n=29)	p
Gram, n (%)				0,048
Gram -	31 (67,4)	15 (34,9)	14 (60,9)	
Gram +	11 (23,9)	18 (41,9)	6 (26,1)	
Mixe Gram - et Gram +	4 (8,7)	8 (18,6)	2 (8)	
Autre	0 (0)	2 (4,7)	1 (4,3)	
Typage du germe, n (%)				0,005
Gram -				
<i>E. Coli</i>	27(58,7)	12 (27,9)	4 (17,4)	
<i>N. Méningitidis</i>	1 (2,2)	1 (2,3)	1 (4,3)	
Autre Gram -	3 (6,5)	2 (4,7)	6 (26,1)	
Gram +				
<i>S. Aureus</i>	3 (6,5)	1 (2,3)	2 (8,7)	
<i>S. Pneumoniae</i>	3 (6,5)	9 (20,9)	3 (13)	
Autre Gram +	5 (10,9)	8 (18,6)	1 (4,3)	
Autre	0 (0)	2 (4,7)	1 (4,3)	
Polymicrobien	4 (8,7)	8 (18,6)	5 (21,7)	
Bactériémie, n (%)	14 (16,9)	19 (28,8)	13 (44,8)	0,010
Primaire	1 (7,1)	2 (10,5)	3 (23,1)	
Secondaire	13 (92,9)	17 (89,5)	10 (76,9)	

3. Données hématologiques

3.1. Populations leucocytaires globales

Tous les patients septiques présentaient une hyperleucocytose à l'inclusion par rapport aux volontaires sains (respectivement 14,4 G/L et 6,7 G/L). Néanmoins, celle-ci n'était pas significativement différente selon les groupes de gravité des patients. Parallèlement on notait un effondrement statistiquement significatif de la population lymphocytaire globale, chez les patients septiques (0,865 G/L chez les patients septiques contre 1,82 G/L chez les témoins).

3.2. Immunophénotypage leucocytaire : analyse diagnostique

Les sous-populations leucocytaires essentiellement prises en compte dans notre étude étaient les granuleux, et plus particulièrement les granuleux immatures (représentés par les marqueurs CD10- et CD16 dim) et activés (représentés par le marqueur CD64+). Les monocytes et plus particulièrement les monocytes inflammatoires (exprimant le marqueur CD16+), responsables d'une partie de la réponse immunitaire non spécifique et jouant un rôle central dans la réponse à l'infection étaient aussi évalués. Les cellules étudiées de l'immunité dite spécifique étaient les lymphocytes (notamment les lymphocytes B, T, T régulateur et Natural Killer) et les cellules dendritiques.

3.2.1. Comparaison des patients et témoins

➤ Granuleux immatures et activés

Les différents paramètres cellulaires étudiés (CD64+, CD10- et CD16 dim) étaient très significativement différents entre le groupe de patients en Sepsis et les témoins. En effet on retrouvait une proportion plus importante de granulocytes immatures n'exprimant pas le CD10 et peu le CD16 chez les patients septiques. Parallèlement on notait une proportion plus importante de granuleux activés exprimant le marqueur CD64. Cette différence confirme ainsi la modification des profils cellulaires au cours du Sepsis et notamment sur les granuleux immatures et activés parmi les granuleux totaux (tableau 4).

Tableau 4 : Comparaison des cellules granuleuses entre patients et témoins

Paramètres, med [Q1 ; Q3]	Patients (n = 178)	Témoins (n = 50)	p
Proportion de Granuleux CD10- (%)	68.435 [32.62 ; 93.44]	0.275 [0.02 ; 0.86]	< 0,001
Proportion de Granuleux CD64+ (%)	14.045 [1.19 ; 54.68]	0.2 [0.15 ; 0.25]	< 0,001
Proportion de Granuleux CD16dim (%)	6.33 [1.83 ; 22]	0.372 [0.267 ; 0.63]	< 0,001

➤ Les monocytes

Les monocytes et promonocytes étaient significativement plus présents dans le sang périphérique des patients septiques par rapport aux témoins en valeur absolue (tableau 5).

Néanmoins on ne constatait pas de différence significative dans l'expression du marqueur CD16, parmi les monocytes (correspondant aux monocytes pro-inflammatoires) entre les 2 groupes étudiés.

Tableau 5 : Comparaison des populations monocytaires entre patients et témoins

Paramètres, med [Q1 ; Q3]	Patients (n = 178)	Témoins (n = 50)	p
Monocytes (G/l)	0,811 [0.434 ; 1.213]	0,528 [0.406 ; 0.72]	0,001
Promonocytes (G/l)	0,008 [0,004 ; 0.018]	0,014 [0.011 ; 0.018]	<0,001
Proportion de Monocytes CD16+ (%)	9.77 [5.35 ; 17.51]	10.55 [9.47 ; 13.35]	0,337

➤ Lymphocytes

Parmi les sous-populations lymphocytaires prises en compte dans notre étude, on constatait une diminution significative du nombre de lymphocytes B en valeur absolue chez les patients présentant un processus infectieux. Cette différence apparaissait aussi pour la sous-population des précurseurs médullaires B (hématogones) (tableau 6).

Par ailleurs on notait aussi une baisse significative de toutes les autres sous-populations lymphocytaires : lymphocytes T, Natural Killer (NK) et T régulateur (T reg) des patients septiques par rapport aux témoins (tableau 6).

Tableau 6 : Comparaison des populations lymphocytaires entre patients et témoins

Paramètres, med [Q1 ; Q3]	Patients (n = 178)	Témoins (n = 50)	p
Lymphocytes B CD19 (G/l)	0,123 [0.083 ; 0.234]	0,199 [0.115 ; 0.268]	0,020
Hématogones (G/l)	0,002 [0 ; 0.004]	0,005 [0.003 ; 0.011]	<0,001
Lymphocytes T CD3+ (G/l)	0,541 [0.348 ; 0.93]	1,278 [1.036 ; 1.683]	<0,001
Lymphocytes T CD4+ (G/l)	0,322 [0.188 ; 0.543]	0,769 [0.554 ; 0.918]	<0,001
Lymphocytes T CD8+ (G/l)	0,164 [0.079 ; 0.301]	0,413 [0.296 ; 0.578]	<0,001
Lymphocytes NK (G/l)	0,154 [0.079 ; 0.263]	0,259 [0.152 ; 0.374]	<0,001
Lymphocytes NK like (G/l)	0,02 [0.007 ; 0.047]	0,031 [0.019 ; 0.068]	0,002
Lymphocytes Treg (G/l)	0,019 [0.011 ; 0.032]	0,046 [0.033 ; 0.059]	<0,001

➤ Cellules dendritiques

Parmi les cellules dendritiques, nos résultats montraient une diminution significative du nombre de cellules dendritiques plasmacytoïdes chez les patients septiques quel que soit leur gravité. Cette différence n'était pas retrouvée pour les cellules dendritiques myéloïdes (tableau 7). En effet cette population était quasi inexistante dans les 2 groupes.

Tableau 7 : Comparaison des cellules dendritiques entre patients et témoins

Paramètres, med [Q1 ; Q3]	Patients (n = 178)	Témoins (n = 50)	p
Cellules dendritiques myéloïdes (G/l)	0 [0 ; 0.001]	0 [0 ; 0.001]	0,726
Cellules dendritiques plasmacytoïdes (G/l)	0,001 [0 ; 0.004]	0,009 [0.006 ; 0.011]	<0,001

3.2.2. *Comparaison des groupes sepsis, sepsis sévère et choc septique à l'inclusion*

➤ Granuleux immatures et activés

La gravité du Sepsis semble être corrélée à la surreprésentation des granuleux n'exprimant pas ou peu les marqueurs CD10 et CD16 (figure 28). En effet on retrouvait des différences significatives concernant leur proportion dans le sang total entre les groupes Sepsis, Sepsis sévère et choc septique (respectivement 55,7%, 83,1% et 93,2% pour les granuleux CD10- ; et respectivement 2,5%, 11,1% et 31,1% pour les granuleux CD16 dim).

Parallèlement on ne retrouvait pas de différence statistique quant à la présence des granuleux CD64+ activés.

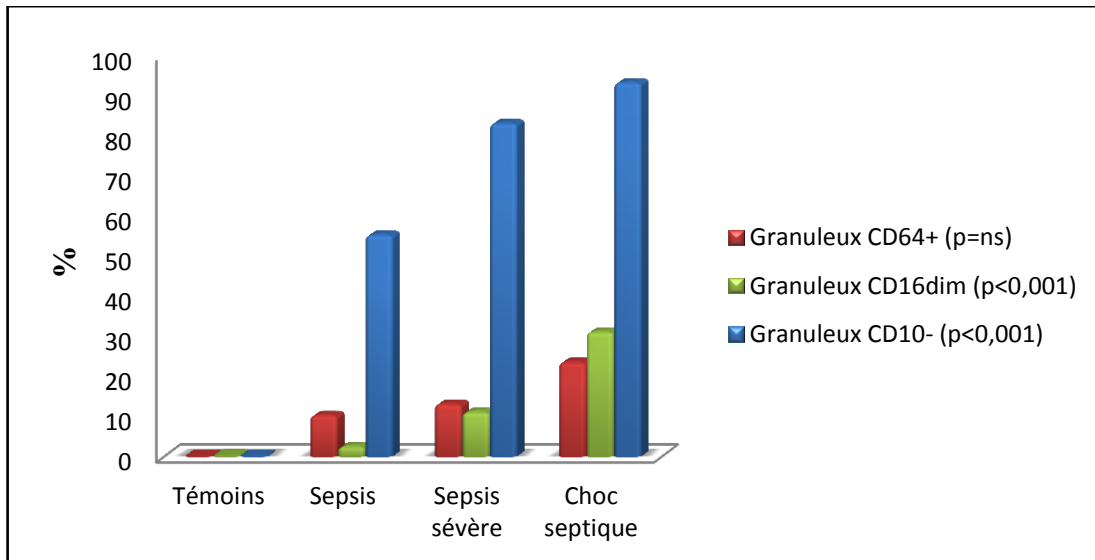


Figure 28 : Pourcentage de granuleux immatures et activés selon les groupes à l'inclusion

➤ Monocytes

Au sein de la réponse immunitaire non spécifique, le nombre (en valeur absolue : G/l) de monocytes et de promonocytes semble être corrélé à la gravité du Sepsis. En effet on notait une nette diminution des monocytes et promonocytes dans les groupes les plus sévères (tableau 8).

Cette corrélation n'était pas retrouvée pour la sous population monocyttaire pro-inflammatoire CD16+.

Tableau 8 : Comparaison des populations monocytaires selon les groupes à l'inclusion

Paramètres, med [Q1 ; Q3]	Sepsis (n=83)	Sepsis sévère (n=66)	Choc septique (n=29)	p
Monocytes (G/l)	0,979 [0.667;1.358]	0,659 [0.424;1.14]	0,429 [0.274;0.763]	<0,001
Promonocytes (G/l)	0,009 [0.006;0.018]	0,006 [0.003;0.016]	0,005 [0.002;0.011]	0,031
Proportion de Monocytes CD16+ (%)	10,55 [5.401;16.505]	8,39 [4.319;17.453]	11,04 [8,365;18.193]	0,451

➤ Lymphocytes

Parmi les sous-populations lymphocytaires étudiées, notamment les lymphocytes B et leurs précurseurs (hématogones), aucune n'apparaissait être un marqueur de gravité. En effet leur nombre en valeur absolue ne différait pas statistiquement selon les groupes de gravité à l'inclusion.

A contrario, on notait une diminution significative du nombre de lymphocytes T dans les groupes d'inclusion les plus graves (figure 29).

Cette différence n'était pas constatée pour les lymphocytes NK et les T reg même si on constatait une tendance à la diminution dans les groupes les plus graves à l'inclusion.

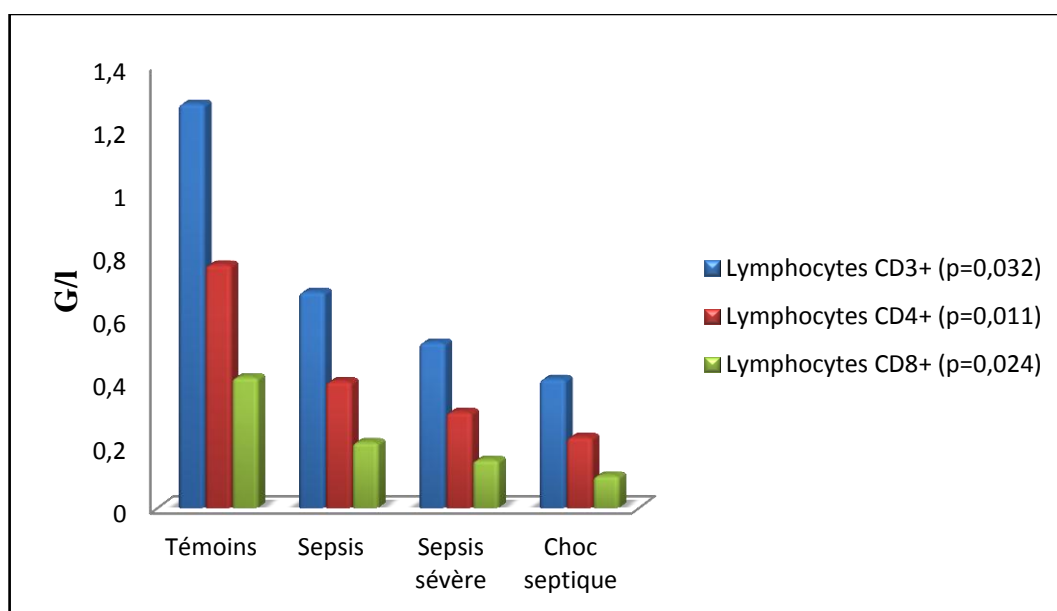


Figure 29 : Populations lymphocytaires T selon les groupes de gravité à l'inclusion

➤ Cellules dendritiques

Le taux de cellules dendritiques plasmacytoïdes semble être aussi corrélé à la gravité du Sepsis. En effet on constatait une diminution significative du nombre de ces cellules en valeur absolue entre les groupes Sepsis et les groupes Sepsis sévère et choc septique (figure 30).

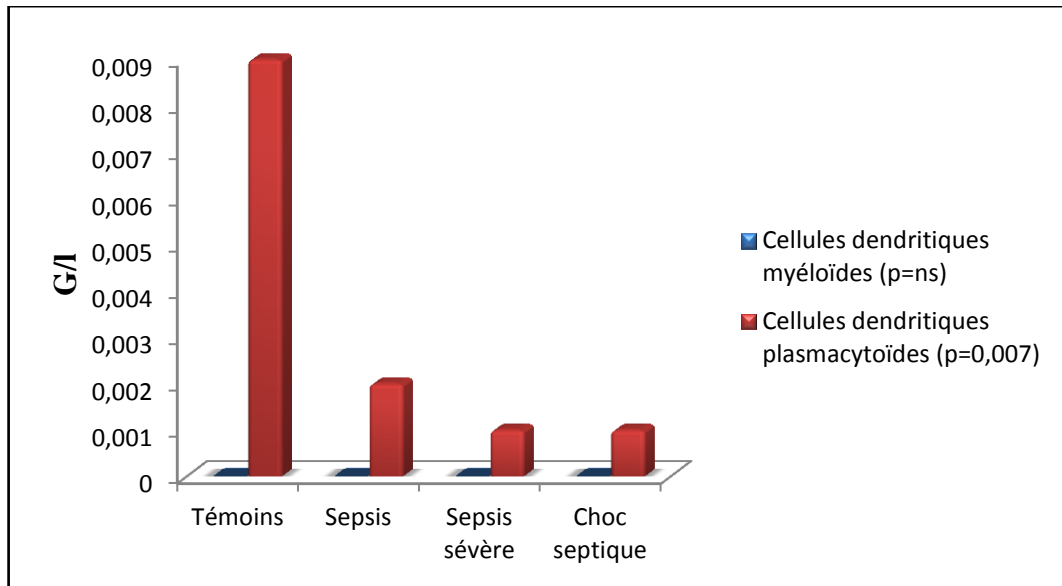


Figure 30 : Comparaison des cellules dendritiques selon les groupes de gravité

3.3. Immunophénotypage leucocytaire : analyse pronostique

3.3.1. Evolution précoce : amélioration/stabilité contre dégradation

➤ Granuleux immatures et activés

L'évolution précoce dans les 48 premières heures des patients en Sepsis vers la dégradation ou la stabilité voire l'amélioration semble être corrélée à la proportion de granuleux CD10- et CD16 dim exprimés. En effet on constatait une augmentation significative des granuleux n'exprimant pas le marqueur CD10 et des granuleux sous exprimant le marqueur CD16 dans le groupe dégradation précoce (respectivement 93,2% et 34,2% dans le groupe dégradation contre 61,3% et 4,92% dans le groupe amélioration ou stabilité) (figure 31). Là encore le taux de granuleux activés exprimant le CD64 ne semble pas être lié au potentiel évolutif des patients.

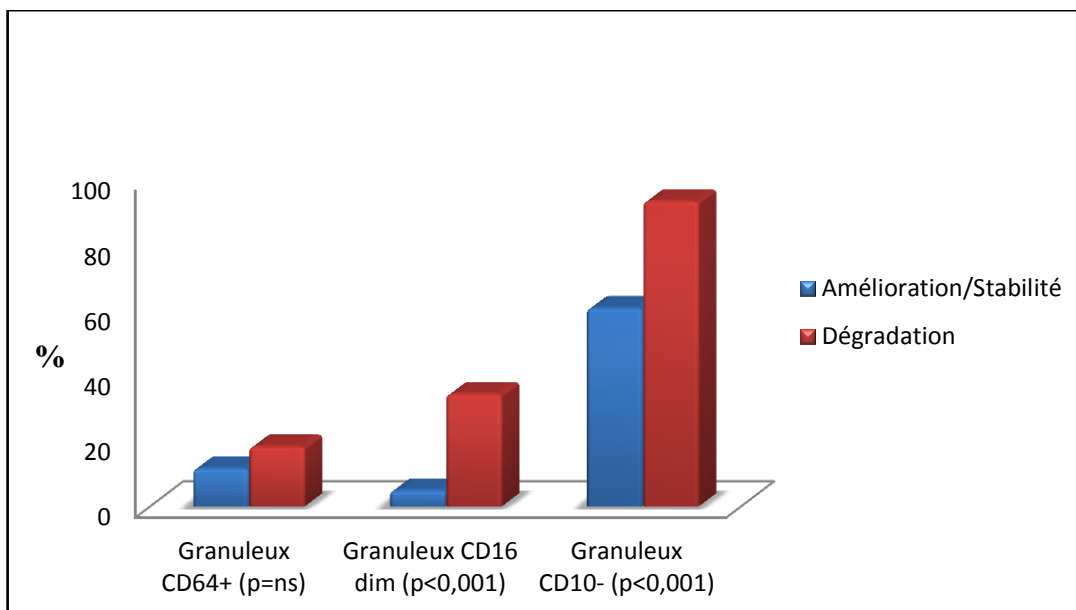


Figure 31 : Pourcentage de granuleux immatures et activés selon l'évolution précoce

➤ Monocytes

Parmi les populations monocytaires seul le taux de monocytes globaux semble être corrélé à une évolution précoce défavorable (tableau 9). En effet les patients évoluant défavorablement avaient un taux significativement plus bas de monocytes par rapport aux patients stables ou s'améliorant.

Tableau 9 : Comparaison des populations monocytaires selon l'évolution précoce

Paramètres, med [Q1 ; Q3]	Amélioration/Stable (n = 135)	Dégradation (n = 43)	P
Monocytes (G/l)	0,855 [0.563 ; 1.241]	0,459 [0.245 ; 1.072]	0,001
Promonocytes (G/l)	0,008 [0,004 ; 0.018]	0,006 [0.002 ; 0.017]	0,119
Proportion de Monocytes CD16+ (%)	9,657 [5.338 ; 16,667]	12,423 [6.224 ; 20.06]	0,181

➤ Lymphocytes

Le taux des sous-populations lymphocytaires B (et notamment les lymphocytes B et les précurseurs des lymphocytes B) et NK dans notre étude, n'apparaît pas comme prédictif d'une évolution défavorable des patients. En effet aucune différence significative n'était retrouvée en termes de nombre en valeur absolue de lymphocytes. Néanmoins on notait une diminution de ces différentes sous populations chez les malades qui se dégradaient précocement. A contrario, les patients septiques se dégradant précocement présentaient un taux significativement plus bas de lymphocytes T et de lymphocytes T reg (figure 32).

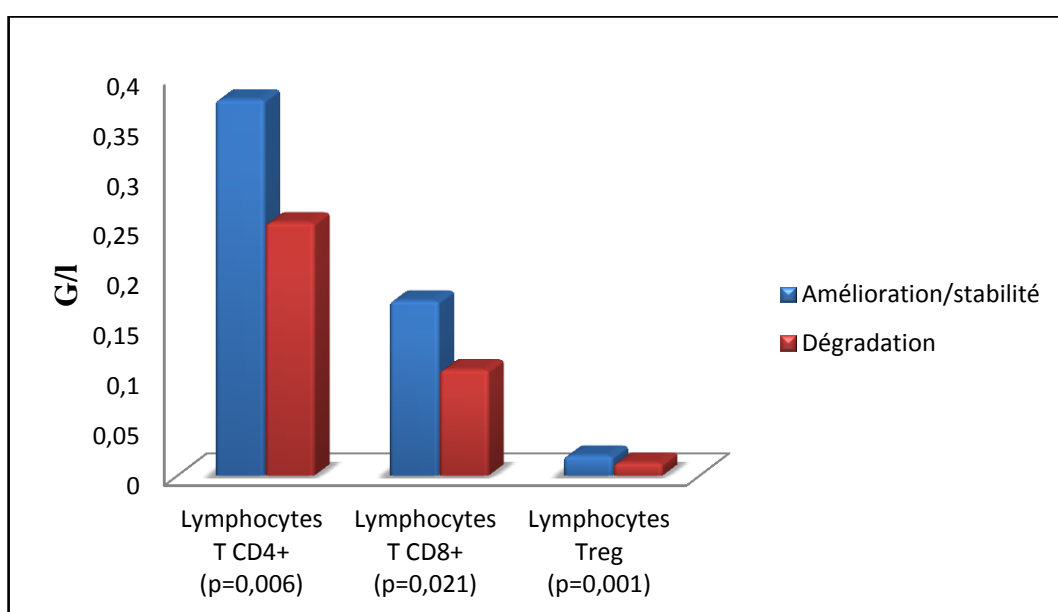


Figure 32 : Comparaison des populations lymphocytaires selon l'évolution précoce

➤ Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques et notamment les cellules dendritiques plasmacytoïdes étaient statistiquement moins représentées chez les patients se dégradant précocement, aucune différence significative n'étant retrouvée pour les cellules dendritiques myéloïdes dans notre étude (figure 33).

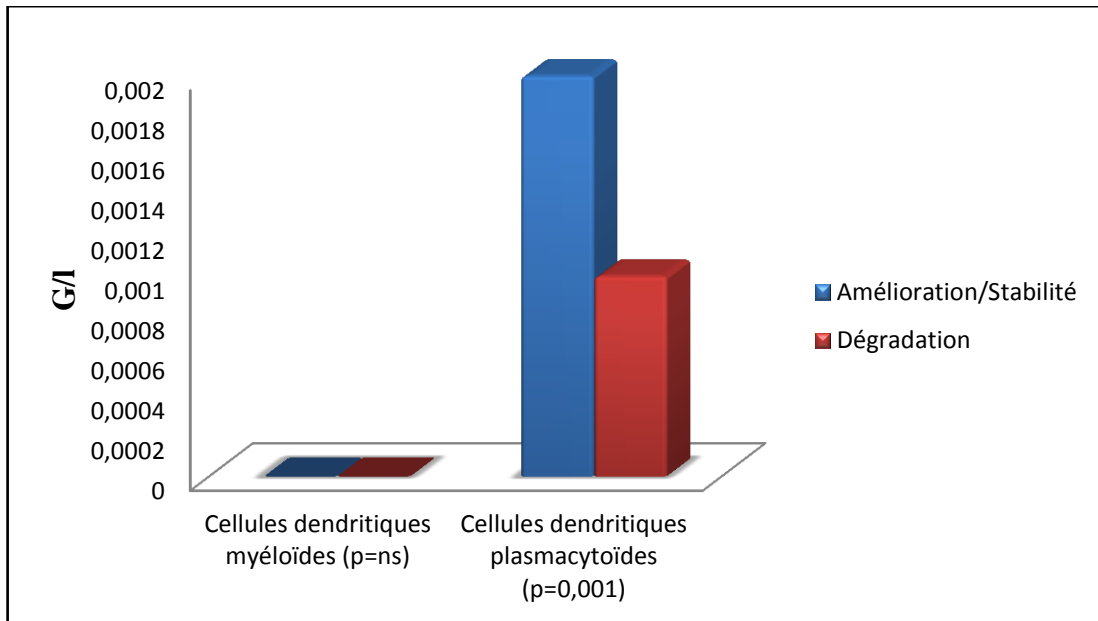


Figure 33 : Comparaison des cellules dendritiques selon l'évolution précoce

3.3.2. Evolution au 7^{ème} jour : décédés contre survivants

➤ Granuleux immatures et activés

La population de granuleux immatures dont l'expression du CD16 est diminuée, était surreprésentée chez les patients qui allaient décéder ($p < 0,001$). De même, le pourcentage de granuleux n'exprimant pas le CD10 était nettement supérieur chez les malades pour qui l'issue était défavorable ($p < 0,001$) (figure 34).

Par ailleurs on ne notait pas de différence significative en ce qui concerne l'expression du CD64 sur les granulocytes activés entre les 2 groupes même si cette sous-population était augmentée chez les patients décédant du Sepsis.

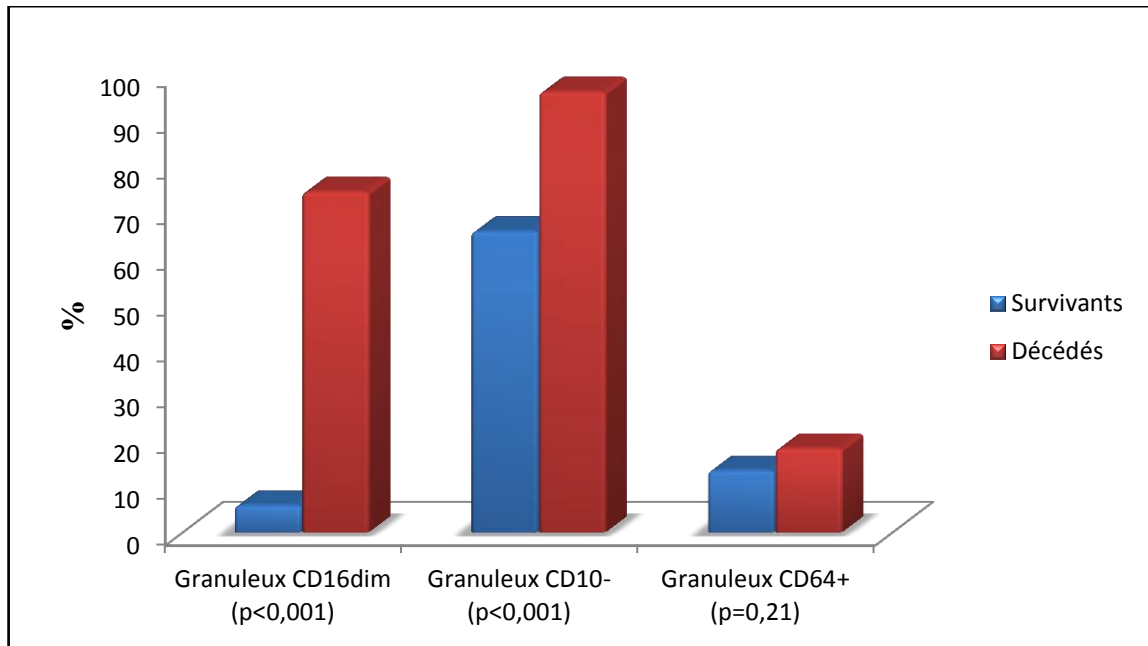


Figure 34 : Pourcentage de granuleux immatures et activés selon l'évolution à J7

➤ Monocytes

Là encore, comme pour l'évolution précoce, seul le nombre global de monocytes semble être corrélé à une évolution défavorable au 7^{ème} jour. En effet les patients qui décédaient du Sepsis avaient un nombre significativement plus faible de monocytes circulants que les patients survivants (respectivement 0,332 G/L et 0,838 G/L).

➤ Lymphocytes

Là aussi les sous populations lymphocytaires (lymphocytes B, précurseurs des cellules B, lymphocytes T, lymphocytes NK et Treg) étudiées ne semblent pas être des marqueurs pronostiques d'évolution défavorable chez le patient septique. En effet aucune différence significative n'était retrouvée entre les patients décédant ou survivant au Sepsis en termes de nombre en valeur absolue ou pourcentage dans notre étude. Néanmoins on constatait là encore, une diminution des sous populations en cas d'évolution défavorable.

➤ Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes quant à elles paraissaient être diminuées significativement chez les patients dont l'évolution au 7^{ème} jour était défavorable contrairement aux cellules dendritiques myéloïdes.

Tableau 10 : Comparaison des cellules dendritiques selon l'évolution au 7ème jour

Paramètres, med [Q1 ; Q3]	Vivants (n = 162)	Décédés (n = 15)	P
Cellules dendritiques myéloïdes (G/I)	0 [0 ; 0.001]	0 [0 ; 0.001]	0,817
Cellules dendritiques plasmacytoïdes (G/I)	0,001 [0,001 ; 0,004]	0,001 [0 ; 0.001]	0,022

3.4. Populations leucocytaires d'intérêt dans l'étude

Dans notre étude, plusieurs sous-populations leucocytaires apparaissaient comme informatives pour le diagnostic de Sepsis notamment les granuleux (immatures et activés), les lymphocytes et les cellules dendritiques.

Par ailleurs, seul le taux à l'inclusion de granuleux immatures, de lymphocytes et de cellules dendritiques était prédictif d'une évolution défavorable à 48 heures.

En ce qui concerne l'évolution tardive, seuls les granuleux immatures et les cellules dendritiques étaient discriminants (tableau 11).

Tableau 11 : Récapitulatif de l'intérêt diagnostique et pronostique des populations

Paramètres	Diagnostic	Pronostic précoce	Pronostic tardif
Granuleux activés	Oui	Non	Non
Granuleux immatures	Oui	Oui	Oui
Monocytes pro-inflammatoires	Non	Non	Non
Lymphocytes	Oui	Oui	Non
Cellules dendritiques	Oui	Oui	Oui

3.5. Exemples de profils cellulaires

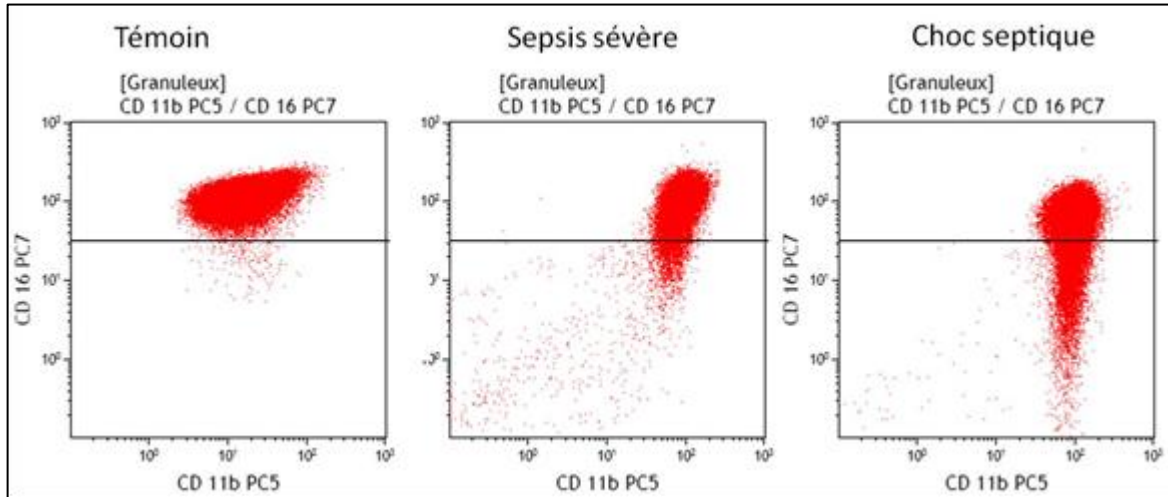


Figure 35 : Expression du marqueur CD16 diminuée lors du Sepsis

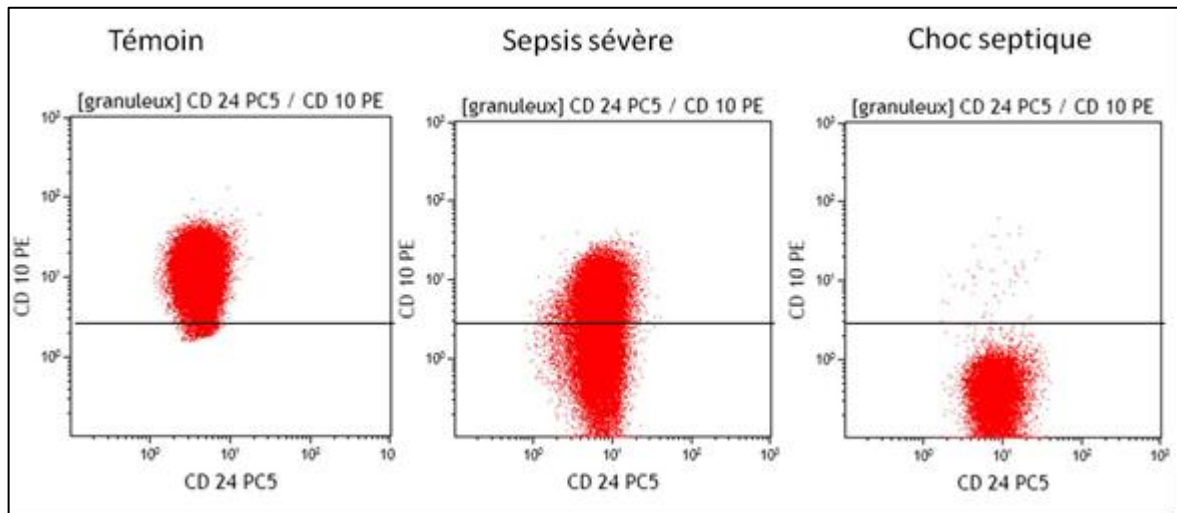


Figure 36 : Proportion plus marquée de granuleux CD10- lors du Sepsis

DISCUSSION

1. Problématique

Le Sepsis est une des causes majeures d'admission en réanimation et une des principales causes de décès chez les patients hospitalisés quel que soit leur service d'admission. L'essentiel des difficultés pour le clinicien réside dans la détection précoce des patients présentant un SIRS, potentiellement victime d'un processus infectieux et dans l'évaluation d'un profil évolutif, notamment aggravatif. Les sociétés savantes se sont ainsi efforcées d'élaborer des définitions dans le but de fournir au praticien une aide au diagnostic et au pronostic des patients présentant un syndrome de réponse inflammatoire systémique à une agression, et dont la cause est inconnue jusqu'alors. Malgré tout, ces définitions sont imparfaites du fait de leur faible sensibilité et spécificité. Néanmoins elles ont permis ces dernières années d'homogénéiser des groupes de patients inclus dans des études sur le Sepsis qu'elles soient physiopathologiques, épidémiologiques ou thérapeutiques.

Un autre point essentiel est la rapidité de la prise en charge des patients septiques. En effet tout retard thérapeutique est grevé d'une augmentation de la morbi-mortalité de cette pathologie. C'est dans cet esprit que depuis de nombreuses années, beaucoup d'équipes se sont attachées à découvrir des marqueurs (biologiques, immunologiques, génétiques...) précoces, sensibles et spécifiques au Sepsis. Néanmoins en pratique quotidienne les outils utilisés restent peu nombreux. Ils sont relatifs essentiellement aux données de l'hémogramme conventionnel, aux données bactériologiques (souvent longues à obtenir) et aux protéines de l'inflammation (restant peu spécifiques).

Etant donné que la physiopathologie du Sepsis et sa gravité sont basées sur la réponse immunitaire spécifique ou non de l'hôte à une agression microbienne, un outil reflétant le statut immunologique du patient pourrait s'avérer être une précieuse aide disponible rapidement.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude prospective, portant sur l'intérêt d'un immunophénotypage leucocytaire étendu par cytométrie en flux à la phase aigüe du Sepsis.

2. Caractéristiques de la population

De façon globale, notre cohorte de patients était constituée majoritairement d'hommes et ce d'autant plus que le Sepsis était grave. L'âge moyen des patients recrutés étaient de 60 ans +/- 19 ans, sans différence significative selon la gravité du Sepsis. Ces données sont concordantes avec toutes celles de la littérature.

Depuis quelques années il semble y avoir une augmentation de la sévérité de la pathologie infectieuse. Une étude rétrospective publiée en 2003, évaluant l'épidémiologie du Sepsis aux Etats-Unis de 1979 jusqu'à l'année 2000 et portant sur plus de 10 000 000 de patients, retrouvait une augmentation du taux de sepsis avec au moins 1 défaillance d'organe (soit environ 43,6% des patients présentant au moins un Sepsis sévère à la fin des années 90) [6]. Cette proportion semble être respectée dans notre étude. En effet on note que 53% des patients présentaient un Sepsis sévère ou un choc septique.

De façon attendue, notre étude montre une majoration de la mortalité à 7 jours parallèlement à la sévérité du Sepsis : 0% pour le Sepsis, 7,6% pour le Sepsis sévère et 34,5% pour le choc septique. Ces résultats sont légèrement en dessous des taux observés dans différentes études. Par exemple Rangel-Frausto retrouvait dans une étude menée dans les années 90 une mortalité de 16% pour le Sepsis, 20% pour le Sepsis sévère et 46% pour le choc septique [4]. Cette différence peut s'expliquer par le fait que ces études tenaient compte de la mortalité à 28 jours (et non à 7 jours comme dans ce travail) et par l'amélioration constante des techniques de réanimation. En effet notre population et notamment les patients en choc septique n'étaient pas moins graves que celles de la littérature, avec un score SOFA médian calculé à 8 pour les patients en choc septique. Environ 25% des patients avaient au moins 1 défaillance d'organe et les plus fréquentes étaient métabolique, respiratoire et circulatoire. Ces données sont comparables à celles retrouvées dans la littérature [5,6,118].

En ce qui concerne les données bactériologiques, dans notre étude l'origine de l'infection était majoritairement communautaire. Ces données sont nettement supérieures à la plupart des données de la littérature. Par exemple dans l'étude française du groupe EPISEPSIS [5], l'origine communautaire du processus infectieux n'était retrouvée que dans 50% des cas. Cette étude réalisée en 2001 dans 206 réanimations françaises, portait sur une cohorte de patients hospitalisés en réanimation pour un Sepsis sévère ou développant un Sepsis sévère au cours de leur séjour en réanimation. Ces critères d'inclusions (et notamment l'inclusion des patients déjà hospitalisés en réanimation), permet d'expliquer la plus grande proportion d'infections nosocomiales. A contrario, la majorité des patients inclus dans notre

étude était recrutée à partir des admissions des urgences, expliquant ainsi la forte prépondérance de l'origine communautaire. Néanmoins dans le groupe choc septique cette différence s'amenuise (origine communautaire dans 62,9% des cas) car une proportion plus importante de ces patients admis en réanimation était des patients chirurgicaux déjà hospitalisés.

Les principaux sites d'infection étaient : abdominaux, pulmonaires, urinaires et cutanés dans la population globale. Néanmoins on note une augmentation nette des infections intra-abdominales dans les groupes les plus graves, probablement expliquée par le recrutement de patients chirurgicaux en réanimation polyvalente. Ces résultats diffèrent avec ceux de la littérature, en effet beaucoup d'études tendent à démontrer une décroissance des infections intra-abdominales et une augmentation des infections pulmonaires dans le choc septique. En effet une revue de la littérature publiée en 1998 [119], intégrant au total plus de 10 000 patients en choc septique et portant sur des études de 1958 à 1997, retrouvait une nette prédominance des infections pulmonaires après les années 90. Cette augmentation était expliquée par les auteurs par l'utilisation de plus en plus fréquente de la ventilation mécanique en réanimation. De la même façon, notre étude relate une faible proportion d'infection à gram +, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature ces dernières années. Ce contraste peut s'expliquer en partie par la faible proportion d'infections nosocomiales, la prépondérance des infections intra abdominales et urinaires par rapport à la littérature. Cette dernière explique en partie la forte proportion d'infection à *E. Coli* dans notre étude. Par ailleurs 25% de nos patients étaient bactériémiques de façon globale. Cette proportion devenait plus importante dans les groupes les plus graves (environ 30% des Sepsis sévères et 45% des chocs septiques). Ces taux correspondent à ceux observés dans la littérature [120,118].

Dans notre étude de façon globale l'infection était documentée cliniquement ou microbiologiquement dans 60% des cas quel que soit la gravité du Sepsis. Cette documentation était plus importante et notamment la documentation bactériologique et de ce fait le niveau d'évidence plus fort dans les groupes les plus graves (62,1% dans les Sepsis sévères et 78,6% dans les chocs septiques) conformément aux données de la littérature. En effet par exemple dans l'étude prospective de Brun-Buisson publiée en 1995 [120], réalisée dans 170 réanimations françaises, incluant des patients en Sepsis sévère ou en choc septique cliniquement présumée, une documentation bactériologique était confirmée dans plus de 70% des cas. Ces résultats témoignent de la qualité de notre recrutement en partie grâce au codage strict des dossiers médicaux selon les définitions usuelles.

3. Données hématologiques : diagnostic et pronostic

Notre analyse était essentiellement portée sur la mise en évidence des granulocytes activés CD64+, sur les granulocytes immatures (CD10- et CD16 dim), sur les monocytes pro-inflammatoires CD16+, les différentes sous populations lymphocytaires et les cellules dendritiques.

3.1. Granulocytes immatures et activés

Les granulocytes immatures sont normalement situés dans la moelle. A l'exception des nouveau-nés, ils sont rarement observés dans le compartiment sanguin d'individus sains. Leur présence indique une augmentation de la production cellulaire myéloïde. Cette situation peut se retrouver dans de nombreuses pathologies et notamment le Sepsis. Les granulocytes activés expriment à leur surface le marqueur CD64 (FcγRIII). Il est par ailleurs faiblement exprimé à la surface des neutrophiles non activés. Son expression est induite par le G-CSF et l'INFγ.

3.1.1. Population granuleuse activée CD64+

Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence une proportion significativement plus importante de granulocytes activés CD64+ parmi les granulocytes, chez les patients septiques (14,3% chez les patients versus 0,2% chez les témoins). Ces données en termes diagnostiques sont comparables à celle de la littérature. Par exemple l'étude prospective réalisée en 2007 par Nuutila [93], incluant 289 patients fébriles suspects d'infection dont 135 confirmées cliniquement ou bactériologiquement et 60 individus sains, montrait une proportion significativement plus importante de granulocytes activés CD64+ par rapport aux volontaires sains. La sensibilité et la spécificité diagnostique était respectivement de 86% et 98%. Ces résultats ont été confirmés plus récemment par une méta-analyse [91].

En termes pronostiques nos résultats ne sont pas significatifs entre les différents groupes d'évolution précoce ou au 7^{ème} jour des patients. Ces données sont comparables avec celles de la littérature. En effet les travaux évaluant l'intérêt pronostique du marqueur CD64+ sont contradictoires [97,92].

Ainsi notre étude semble confirmer que le marqueur CD64+ autorise la différenciation des patients septiques et des patients non septiques mais sans valeur pronostique fiable.

3.1.2. Population granuleuse immature CD10-

Très peu d'études dans la littérature ont évalué l'intérêt diagnostique et pronostique du marqueur CD10 à la surface des granulocytes.

La première étude publiée en 1995 [98], a démontré une susceptibilité accrue au choc endotoxinique et une surmortalité chez des souris pour lesquelles l'expression du gène du marqueur CD10 était bloquée. Un autre travail réalisé en 1999 par Martens [100] a montré une moindre expression du marqueur CD10 sur les neutrophiles des patients en choc septique, par rapport à des volontaires sains et des patients porteurs de la mononucléose (30 sujets au total), après incubation *in vitro* d'échantillon sanguin avec une suspension de *S. aureus*. Un travail plus récent a démontré de même une réduction de l'expression du marqueur CD10 à la surface de neutrophiles humains ou animaux (primates) après l'injection « *in vivo* » de LPS ou d'*E. Coli* [99].

Notre étude semble être en accord avec les précédents travaux. En effet les patients septiques par rapport aux patients contrôles développaient une surexpression des immatures granuleux n'exprimant pas le CD10 et ce d'autant plus qu'ils étaient graves à l'inclusion.

Néanmoins aucune étude clinique (la plupart des travaux étaient réalisés sur des modèles animaux ou *in vitro*) n'a évalué l'intérêt pronostique du marqueur CD10. Notre travail tend à montrer un éventuel intérêt pronostique. En effet les patients se dégradant précocement ou décédés au 7^{ème} jour, sur exprimaient encore plus les granuleux dépourvus du marqueur CD10.

3.1.3. Population granuleuse immature CD16dim

Là encore peu d'études cliniques de grande envergure ont évalué l'intérêt diagnostique et surtout pronostique de la mesure des granulocytes immatures à travers l'expression du CD16 (récepteur de faible affinité pour les IgG).

Dans une étude prospective [121], portant sur 14 patients présentant une infection bactérienne et des patients sains, Wagner a démontré une diminution d'expression du marqueur CD16 sur les polynucléaires des patients infectés par rapport à ceux des volontaires sains. Dans une autre étude clinique publiée en 2010 [122], le phénotype des polynucléaires neutrophiles de plusieurs volontaires sains a été étudié 3 heures après l'injection de LPS d'*E. Coli*. Il a été retrouvé entre autre une augmentation significative du nombre de polynucléaires neutrophiles immatures sous exprimant le marqueur CD16 (CD16dim). Une autre étude

prospective menée en 2008 [123], portait sur 55 patients septiques (Sepsis, Sepsis sévère et choc septique), 11 patients présentant des critères de SIRS d'origine non infectieuse et 19 individus sains. Plusieurs marqueurs cellulaires de surface ont été mesurés sur les polynucléaires neutrophiles (dont le CD16) et comparés à la procalcitonine pour le diagnostic du Sepsis en réanimation. Cette étude a ainsi montré une proportion plus importante de polynucléaires sous exprimant le CD16 et ce d'autant plus que les patients étaient graves. Néanmoins ils n'ont pas retrouvé de différence significative entre les survivants et les patients décédés du Sepsis.

Notre étude semble confirmer ces résultats. En effet, on constate une proportion plus importante de granulocytes immatures exprimant peu le marqueur CD16 chez les patients septiques et ce d'autant plus qu'ils sont sévères. Parallèlement on constate la aussi une proportion plus importante de granulocytes sous exprimant le CD16 chez les patients qui vont se dégrader précocement ou décéder dans les 7 jours.

3.2. Population monocytaire

3.2.1. Monocytes et promonocytes

Les monocytes, véritables piliers de la réponse immunitaire non spécifique, sont capables de sécréter de nombreuses cytokines régulant la réponse immunitaire et l'inflammation.

La corrélation entre effondrement du nombre de monocytes circulants et sévérité du Sepsis observée dans notre étude a déjà été établie auparavant [124]. Williams a observé une augmentation de l'apoptose sur les monocytes circulants des patients septiques [101], et ce d'autant plus que ces patients allaient décéder du Sepsis [102].

3.2.2. Monocytes pro-inflammatoires CD16+

Les monocytes pro-inflammatoires CD16+ (sécrétant de façon importante la cytokine TNF) représentent environ 10% de la population monocytaire chez les individus sains [125]. Cette proportion semble accrue chez les patients victimes d'un processus infectieux, suggérant ainsi leur rôle prépondérant dans l'inflammation.

De même que pour les granulocytes immatures peu d'études dans la littérature concernent l'intérêt diagnostique et pronostique des monocytes pro-inflammatoires (CD14+

CD16+).

Un travail a porté en 1993 sur l'évaluation des monocytes pro-inflammatoires de 18 patients septiques en réanimation et 35 témoins sains [104]. Les auteurs ont retrouvé une proportion plus importante de monocytes pro-inflammatoires chez les patients septiques par rapport aux témoins (10% de la population monocyttaire chez les témoins versus au moins 20% chez les patients présentant un processus infectieux). Des résultats similaires ont été retrouvés dans diverses études plus récentes [126]. Néanmoins dans une récente revue de la littérature publiée en 2007 [103], les auteurs rappelaient que cette population monocyttaire pro-inflammatoire pouvait être aussi surreprésentée dans diverses pathologies inflammatoires non infectieuses (rhumatisme articulaire aigüe, l'hémodialyse, la circulation extra corporelle...).

Dans notre étude cette population ne semble pas être discriminante pour le diagnostic du Sepsis, ni pour caractériser le profil évolutif des patients septiques à court ou plus long terme.

3.3. Les lymphocytes

Les populations lymphocytaires sont connues depuis quelques années pour involuer au cours des processus infectieux et prédisposer ainsi les patients aux infections nosocomiales secondaires. Toutes les sous-populations semblent être touchées et notamment les lymphocytes B, les lymphocytes T, les lymphocytes NK et les lymphocytes T régulateurs. Hotchkiss a démontré chez 27 patients septiques une nette diminution, par apoptose, des cellules B et des lymphocytes T dans des échantillons spléniques par rapport à celles de 2 autres groupes de patients (25 patients traumatisés et 16 patients de réanimation non septiques). Néanmoins cette étude n'a pas été réalisée à la phase aigüe du Sepsis [106].

En termes diagnostiques, Venet en 2010 [108], a réalisé un monitoring précoce des lymphocytes (et notamment des lymphocytes B, T et NK) au moment du diagnostic du Sepsis chez 21 patients en choc septique. Leurs résultats confirmaient l'apoptose des lymphocytes B, T et NK de manière précoce au cours d'un processus infectieux.

Du point de vue de la sévérité, une autre étude portant sur 23 patients en choc septique, 25 patients en Sepsis et 25 patients contrôles, montrait une diminution significative du nombre de lymphocytes touchant toutes les sous-populations chez les patients septiques et ce d'autant plus que ces patients étaient graves à la phase aigüe [109].

Un travail portant essentiellement sur les lymphocytes NK et T régulateurs chez 26 patients en choc septique et 7 patients volontaires sains, retrouvait un nombre significativement plus faible de ces 2 sous-populations chez les patients septiques. Néanmoins aucune différence n'était retrouvée entre les survivants et les patients décédés [127].

Par ailleurs en ce qui concerne la valeur pronostique du compte des sous-populations lymphocytaires, la plupart des études dans la littérature évaluaient la ré-ascension de leur nombre durant les 7 premiers jours du Sepsis et non leur taux à l'inclusion.

Dans notre travail nous avons pu noter une diminution significative de l'ensemble des sous-populations lymphocytaires chez les patients victimes d'un processus infectieux quel que soit leur niveau de gravité, confirmant ainsi leur intérêt diagnostique. D'autre part leur évaluation très précoce semble être moins discriminante en ce qui concerne l'évolution précoce et surtout plus tardive des patients, exception faite des lymphocytes T et des lymphocytes T régulateurs. Un suivi à moyen terme de leur nombre semble être plus adapté au pronostic.

3.4. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques réalisent le lien entre l'immunité non spécifique et l'immunité spécifique. Elles ont une fonction de présentation d'antigènes, d'activation des cellules lymphocytaires et de sécrétion de cytokines notamment l'Il-12. Elles sont de deux types : myéloïdes et plasmacytoïdes. Depuis quelques années, dans la recherche sur le Sepsis, plusieurs auteurs s'accordent à dire que l'immunoparalysie décrite dans les processus infectieux, pourrait être en partie secondaire à l'apoptose des cellules dendritiques.

Une étude prospective portant sur 16 patients présentant un Sepsis sévère ou un choc septique (dont 15 bactériémiques), retrouvait une diminution significative du nombre de cellules dendritiques (myéloïdes et plasmacytoïdes) par rapport à un groupe de 16 donneurs sains [128]. Une autre étude menée par Guisset entre 2002 et 2005 [59], incluant 42 patients dans les 24 premières heures d'un choc septique selon les définitions classiques, montrait des résultats similaires. De plus il notait une diminution des cellules dendritiques d'autant plus importante que les patients décédaient du Sepsis démontrant ainsi le potentiel pronostique de ces cellules.

Dans notre étude, les populations dendritiques plasmacytoïdes apparaissent comme un marqueur diagnostique et pronostique de Sepsis que ce soit en termes d'évolution précoce à 48 heures ou plus tardive au 7^{ème} jour.

4. Limites de l'étude

Notre étude comporte plusieurs limites. Tout d'abord il s'agit d'une étude monocentrique. Ces résultats et notamment leur reproductibilité seront à valider avec d'autres centres. De plus notre analyse a été faite en comparant des patients septiques à des volontaires sains. Dans l'avenir nos résultats devront être confrontés à une population présentant des critères de SIRS d'origine non infectieux pour valider leur intérêt dans le Sepsis. Par ailleurs, nous n'avons pas comparé les différentes sous-populations leucocytaires en fonction des défaillances d'organes ni en fonction des données bactériologiques (sites infectés et gram des germes). Il paraît pourtant intéressant de déterminer si des sous populations leucocytaires sont le reflet de certaines défaillances ou infections, ou seulement le reflet de l'intensité de la réaction inflammatoire ou infectieuse. Enfin cette étude est très exploratoire. Ainsi nos résultats méritent d'être validés dans des études futures.

5. Points forts de l'étude

Notre étude a porté sur un nombre important de patients de façon prospective (178 patients au total), avec pour quasiment chaque patient (171 patients au total) la réalisation d'un immunophénotypage leucocytaire étendu complet (toutes les données n'étant pas analysées dans ce travail). Dans la littérature la plupart des études ont été réalisées sur un effectif beaucoup plus restreint de patients avec un immunophénotypage beaucoup plus limité. De plus nous n'avons souffert que de peu de données manquantes dans le suivi des patients, que ce soit du côté clinique, biologique, bactériologique ou bien hématologique témoignant de la qualité de cette étude. Par ailleurs les analyses hématologiques ont été faites totalement en aveugle du diagnostic et du profil évolutif des patients septiques. Un des autres points forts de notre étude réside en la qualité du recrutement des patients, notamment grâce à un codage minutieux de ceux-ci à posteriori par deux médecins experts. Cette revue des dossiers suivant les dernières recommandations des diverses sociétés savantes concernant les définitions, les stades du Sepsis et l'origine du processus infectieux, nous a permis d'obtenir

des groupes de patients homogènes voire peut-être même à la limite du caricatural. Néanmoins peu d'études dans la littérature tiennent rigoureusement compte de ces définitions pour l'inclusion et la distinction des patients septiques.

Par ailleurs la réalisation de l'immunophénotypage a été effectuée par une équipe experte et reconnue, notamment dans le diagnostic des maladies onco-hématologiques. Ces techniques validées dans différents domaines (hématologie biologique, cancérologie...) paraissent adaptées dans une pathologie complexe telle que le Sepsis. Concernant la réalisation de l'immunophénotypage, celui-ci était effectué dans les 24 heures après le prélèvement sanguin (en moyenne 4 heures), ce qui correspond à la plupart des délais retrouvés dans la littérature. En effet dans différents travaux ce type de délai n'influençait pas la qualité de l'immunophénotypage par cytométrie en flux, du moment que certaines conditions de conservation des échantillons sanguins étaient respectées. Parallèlement cette technique est relativement rapide (en moyenne 3 heures pour l'obtention des résultats).

CONCLUSION

L'immunophénotypage des populations leucocytaires par cytométrie en flux est une technique permettant la détermination d'un statut immunitaire individuel. Récemment cette technique a permis de démontrer l'existence de nombreuses modifications des profils cellulaires secondaires à la présence d'un processus infectieux et notamment selon la gravité de celui-ci. Notre étude s'est attachée à confirmer et explorer ces modifications au travers d'un immunophénotypage étendu, notamment sur les populations granuleuses, monocytaires, lymphocytaires et dendritiques sur un large échantillon de patients. Le diagnostic de Sepsis et sa gravité initiale semblent être ainsi corrélés à une proportion plus importante de cellules de l'immunité innée (granulocytes, monocytes) ainsi qu'à une diminution des cellules de l'immunité spécifique (lymphocytes et cellules dendritiques). Parallèlement le profil évolutif des patients paraît plus en rapport avec l'augmentation des populations granuleuses immatures et la diminution des populations lymphocytaires et dendritiques traduisant les phénomènes apoptotiques.

De plus nous avons pu mettre en évidence des variations de sous-populations leucocytaires jusqu'alors peu explorées dans la littérature. Celles-ci concernent essentiellement les populations granuleuses immatures CD10- et CD16dim. Notre travail a démontré qu'une proportion plus importante de ces 2 sous populations, était de ce fait corrélée au diagnostic du Sepsis, à sa gravité initiale, à une évolution précoce et tardive défavorable.

La caractérisation des sous-populations leucocytaires par cytométrie en flux apparaît donc prometteuse pour l'évaluation du patient septique tant du point de vue diagnostique que pronostique.

Néanmoins ces résultats sont préliminaires et devront dans l'avenir être validés dans une étude multicentrique, sur un plus large échantillon de patients incluant des patients présentant des critères de SIRS d'origine autre qu'infectieuse.

ANNEXES

Annexe 1 : Caractérisation des sous-populations étudiées selon la littérature

Lignée granuleuse : CD45 high, granulosité faible

- **LT CD4+** : CD3+, CD4+
- **LT CD8+** : CD3+, CD8+
- **NK** : CD3-, CD16+et/ou CD56+
- **NK like** : CD3+, CD16+ et/ou CD56+
- **LT activés** : DR+ ou 38+ ou 25+
- **LB** : CD19+

Monocytes : CD45 high, granulosité moyenne

- **Promonocytes** : CD11bdim, CD14dim
- **Monocytes** : CD14+, CD11b+
- **Monocytes non inflammatoires** : CD14+, CD11b+, CD16-
- **Monocytes inflammatoires** : CD14+, CD11b+, CD16+

Neutrophiles : CD45+ high, granulosité élevée

- **Neutrophiles activés** : CD64+
- **Neutrophiles matures non activés** : CD64-
- **Granulocytes immatures** : CD16 faible, CD10-

Eosinophiles: CD45 high, CRTH2+

Basophiles: SSC int, CD45 int, CD16 neg, CD2 pos ou CRTH2 pos

Précurseurs : CD45 dim de granulosité faible ou intermédiaire

- **Précurseurs T** : CD2+ ou CRTH2 pos
- **Précurseurs B** : CD19+ et CD10+, CD34+
- **Promyélocytes** : CD11b+, CD16 neg
- **Myéloblastes** : CD11b dim, CD16 neg

Cellules dendritiques plasmacytoïdes : CD4+, CD123+, CD116-

Cellules dendritiques myéloïdes : CD4+, CD116+

INTERET DIAGNOSTIQUE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX A LA PHASE AIGUE DU SEPSIS : Résultats préliminaires.

R. Bellier (1), E. Guérin (2), M. Orabona (1), A. Dugard (3), O. Barraud (4), E. Lecomte (2), B. Giraudeau (5), J. Feuillard (2), B. François (1)
 (1) Réanimation Polyvalente/CIC 0801 – (2) Laboratoire d'Hématologie/UMR CNRS 6101 – (3) Urgences – (4) Laboratoire de Microbiologie/CIC 0801 [CHU Limoges] – (5) Biostatistiques/CIC 0202 [CHU Tours]



INTRODUCTION

- ✓ Le Sepsis est la deuxième cause de décès en réanimation
- ✓ Le diagnostic du Sepsis et son évolution reposent sur un faisceau d'arguments peu sensibles et peu spécifiques pris individuellement
- ✓ La cytométrie en flux est une technique éprouvée en oncohématologie permettant de discriminer les différentes sous-populations leucocytaires par immunophénotypage
- ✓ Cette méthode pourrait être informative chez le patient septique en fournissant rapidement le profil de la réaction immunitaire cellulaire

BUT DE L'ETUDE

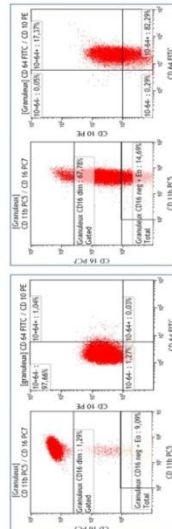
Évaluer l'intérêt diagnostique et pronostique de la cytométrie en flux à la phase aiguë du Sepsis

PATIENTS

- ✓ Tout patient admis au CHU pour Sepsis évoluant depuis moins de 24 heures quelqu'en soit le niveau de gravité est éligible
- ✓ Sont exclus : femme enceinte, mineur, cancer solide ou hématologique, traitement immunosuppresseur

METHODE

- ✓ Étude prospective observationnelle
- ✓ Un échantillon sanguin collecté à l'inclusion est analysé par cytométrie en flux multiparamétrique couleur : FC500 et Navios (Beckman Coulter)
- ✓ 30 sous-populations leucocytaires sont quantifiées en tenant compte de leur état d'activation et de maturation
- ✓ Pour chaque patient sont colligés : l'origine du processus infectieux, la documentation microbiologique, le score SOFA, l'évolution des défaillances d'organe dans le temps, ainsi que le dosage initial de la procalcitonine
- ✓ Deux experts indépendants classent les patients en 3 groupes de gravité (Sepsis, Sepsis Sévère, Choc Septique), conformément à la conférence de consensus



RESULTATS

- ✓ Sur 6 mois, 80 patients consécutifs et 47 témoins ont été inclus
- ✓ Le site de l'infection était abdominal, pulmonaire et urinaire dans respectivement 31%, 22% et 22% des cas

	TEMOINS N=47	SEPSIS N=39	SEPSIS SEVERE N=30	CHOC SEPTIQUE N=11
AGE	-	57+/20	60+/20	57+/19
SOFA I1	-	1.8	5.2	9.3
PCT (ng/ml)	-	14.7	37	49.1
DECES J7	-	0%	13%	45%
Leucocytes G/L	6.470+/3.530	15.530+/6.420	15.570+/19000	14.850+/19.560
Granuleux totaux G/L	3.27+/2.98	11.33+/10.54	11.83+/14.54	11.67+/15.600
Immatures granuleux G/L	0.03+/0.32	0.64+/1.92	2.57+/4.80	3.85+/7.86
Granuleux CD10- CD64+ G/L	0.00	3.83+/9.62	5.35+/11.6	7.78+/15.26
Proportion de Monocytes exprimant CD16+ %	1	8.1	9.4	12.3

- ✓ Analyse diagnostique : comparativement au groupe Sepsis, la valeur de la population granuleuse des groupes Sepsis Sévère et Choc Septique augmente, en particulier les immatures granuleux ($p < 0.001$) et les granuleux CD10-CD64+ ($p < 0.05$)
- ✓ Analyse pronostique : la fluctuation de certaines sous-populations leucocytaires comme les monocytes inflammatoires CD16+ semble pronostique d'une évolution clinique péjorative ($p = 0.047$)

CONCLUSION

L'immunophénotypage leucocytaire par cytométrie en flux paraît prometteur dans l'appréciation initiale du patient septique : l'activation de la réponse immunitaire non spécifique (granuleux immatures) semble un argument diagnostique fort.

BIBLIOGRAPHIE

1. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 2003 ; 31 : 1250-6.
2. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* 1992 ; 20 : 864-74.
3. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 2008 ; 36 : 296-327.
4. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA.* 1995 ; 273 : 117-23.
5. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* 2004 ; 30 :580-8.
6. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 2003 ; 348 : 1546-54.
7. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States : A trend analysis from 1993 to 2003. *Crit. Care Med.* 2007 ; 35 : 1244-50.
8. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 2001 ; 29 : 1303-10.
9. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit. Care Med.* 2001 ; 29 : 109-16.
10. Sprung CL, Sakr Y, Vincent J-L, et al. An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med.* 2006 ; 32 : 421-7.
11. Van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis.* 2008 ; 8 : 32-43.
12. Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit. Care Med.* 2009 ; 37 : 291-304.
13. Shimaoka M, Park EJ. Advances in understanding sepsis. *Eur J Anaesthesiol.* 2008 ; 42 : 146-53.

14. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *Lancet*. 2005 ; 365 : 63-78.
15. Barraud D, Gibot S. Sepsis et choc septique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2007 ; 389 : 29-36.
16. Riedemann NC, Guo R-F, Ward PA. The enigma of sepsis. *J. Clin. Invest.* 2003 ; 112 : 460-7.
17. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2003 ; 348 : 138-50.
18. Monneret G, Venet F, Pachot A, et al. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med.* 2008 ; 14 : 64-78.
19. Thomas L. Germs. *N. Engl. J. Med.* 1972 ; 287 : 553-5.
20. Redl H, Schlag G, Bahrami S. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*. 1998 ; 10 : 442-5.
21. Girardin E, Grau GE, Dayer JM, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N. Engl. J. Med.* 1988 ; 319 : 397-400.
22. Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Opal SM, et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA*. 1994 ; 271 : 1836-43.
23. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet*. 1998 ; 351 : 929-33.
24. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock*. 1999 ; 11 : 153-9.
25. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996 ; 383 : 787-93.
26. Payen D, Faivre V, Lukaszewicz AC, et al. Assessment of immunological status in the critically ill. *Minerva Anesthesiol.* 2000 ; 66 : 351-7.
27. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002 ; 166 : 1475-82.
28. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M, Fitting C, et al. Cytokine cascade in sepsis. *Scand. J. Infect. Dis.* 2003 ; 35 : 535-44.
29. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002 ; 360 : 219-23.

30. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care.* 2010 ; 14 : R15.
31. Póvoa P, Coelho L, Almeida E, et al. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005 ; 11 : 101-8.
32. Schmit X, Vincent JL. The time course of blood C-reactive protein concentrations in relation to the response to initial antimicrobial therapy in patients with sepsis. *Infection.* 2008 ; 36 : 213-9.
33. Ugarte H, Silva E, Mercan D, et al. Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* 1999 ; 27 : 498-504.
34. Simon L, Gauvin F, Amre DK, et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clinical infectious diseases.* 2004 ; 39 : 206-17.
35. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001 ; 164 : 396-402.
36. Balci C, Sungurtekin H, Gurses E, et al. Usefulness of procalcitonin for diagnosis of sepsis in the intensive care unit. *Crit. Care.* 2003 ; 7 : 85-9.
37. Oberholzer A, Steckholzer U, Kurimoto M, et al. Interleukin-18 plasma levels are increased in patients with sepsis compared to severely injured patients. *Shock.* 2001 ; 16 : 411-4.
38. Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 1999 ; 88 : 647-50.
39. Marchant A, Alegre ML, Hakim A, et al. Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. *J. Clin. Immunol.* 1995 ; 15 : 266-73.
40. Selberg O, Hecker H, Martin M, et al. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit. Care Med.* 2000 ; 28 : 2793-8.
41. Gibot S, Kolopp-Sarda M-N, Béné MC, et al. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann. Intern. Med.* 2004 ; 141 : 9-15.
42. Scherpereel A, Depontieu F, Grigoriu B, et al. Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Crit. Care Med.* 2006 ; 34 : 532-7.
43. Rubulotta F, Marshall JC, Ramsay G, et al. Predisposition, insult/infection, response, and organ dysfunction: A new model for staging severe sepsis. *Crit. Care Med.* 2009 ; 37 : 1329-35.

44. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit. Care Med.* 1985 ; 13 : 818-29.
45. Vincent JL, De Mendonça A, Cantraine F, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on « sepsis-related problems » of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit. Care Med.* 1998 ; 26 : 1793-800.
46. Vosylius S, Sipylaite J, Ivaskevicius J. Sequential organ failure assessment score as the determinant of outcome for patients with severe sepsis. *Croat. Med. J.* 2004 ; 45 : 715-20.
47. Clec'h C, Ferriere F, Karoubi P, et al. Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 2004 ; 32 : 1166-9.
48. Lobo SM, Lobo FR, Bota DP, et al. C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest.* 2003 ; 123 : 2043-9.
49. Perry SE, Mostafa SM, Wenstone R, et al. Low plasma granulocyte-macrophage colony stimulating factor is an indicator of poor prognosis in sepsis. *Intensive Care Med.* 2002 ; 28 : 981-4.
50. Angus DC, Yang L, Kong L, et al. Circulating high-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations are elevated in both uncomplicated pneumonia and pneumonia with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 2007 ; 35 : 1061-7.
51. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, et al. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* 2000 ; 181 : 176-80.
52. Van Dissel JT, Van Langevelde P, Westendorp RG, et al. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet.* 1998 ; 351 : 950-3.
53. Monneret G, Finck M-E, Venet F, et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol. Lett.* 2004 ; 95 : 193-8.
54. Schlüter B, Raufhake C, Erren M, et al. Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit. Care Med.* 2002 ; 30 : 32-7.
55. Sutherland AM, Walley KR, Manocha S, et al. The association of interleukin 6 haplotype clades with mortality in critically ill adults. *Arch. Intern. Med.* 2005 ; 165 : 75-82.
56. Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care.* 2009 ; 13 : 210.
57. Christou NV, Meakins JL, Gordon J, et al. The delayed hypersensitivity response and host resistance in surgical patients. 20 years later. *Ann. Surg.* 1995 ; 222 : 534-46.

58. Munoz C, Carlet J, Fitting C, et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J. Clin. Invest.* 1991 ; 88 : 1747–54.
59. Guisset O, Dilhuydy M-S, Thiébaud R, et al. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 2007 ; 33 : 148-52.
60. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br. J. Surg.* 1990 ; 77 : 204-7.
61. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, et al. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br. J. Surg.* 1993 ; 80 : 205-9.
62. Satoh A, Miura T, Satoh K, et al. Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes as a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis. *Pancreas.* 2002 ; 25 : 245-50.
63. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L et al. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004 ; 169 : 1144-51.
64. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006 ; 32 : 1175-83.
65. Felmet KA, Hall MW, Clark RS, et al. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J. Immunol.* 2005 ; 174 : 3765-72.
66. Venet F, Lepape A, Debard AL, et al. The Th2 response as monitored by CRTH2 or CCR3 expression is severely decreased during septic shock. *Clin. Immunol.* 2004 ; 113 : 278-84.
67. Pachot A, Monneret G, Voirin N, et al. Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin. Immunol.* 2005 ; 114 : 61-9.
68. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* 1999 ; 27 : 1230-51.
69. Bilbault P, Lavaux T, Lahlou A, et al. Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care. *Intensive Care Med.* 2004 ; 30 : 408-15.
70. Papathanassoglou ED, Moynihan JA, McDermott MP, et al. Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival. *Crit. Care Med.* 2001 ; 29 : 709-18.
71. Recktenwald DJ. Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration. *J. Hematother.* 1993 ; 2 : 387-94.

72. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.* 2000 ; 46 : 1221-9.
73. Herzenberg LA, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci. Am.* 1976 ; 234 : 108-17.
74. Donnenberg VS, O'Connell PJ, Logar AJ, et al. Rare-event analysis of circulating human dendritic cell subsets and their presumptive mouse counterparts. *Transplantation.* 2001 ; 72 : 1946-51.
75. Keeney M, Gratama JW, Sutherland DR. Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. *Cytometry A.* 2004 ; 58 : 72-5.
76. Schwartz A, Fernández-Repollet E. Quantitative flow cytometry. *Clin. Lab. Med.* 2001 ; 21 : 743-61.
77. Poncelet P. [Microbeads and flow cytometry: how and why put the « -metry » in immuno-cytometry?]. *Ann. Biol. Clin.* 2004 ; 62 : 53-7.
78. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007 ; 106 : 19-39.
79. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, et al. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood.* 2002 ; 100 : 4512-20.
80. Piccioli D, Tavarini S, Borgogni E, et al. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood.* 2007 ; 109 : 5371-9.
81. Shankar P, Russo M, Harnisch B, et al. Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood.* 2000 ; 96 : 3094-101.
82. Maecker HT, Rinfret A, D'Souza P, et al. Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol.* 2005 ; 6 : 13.
83. Faucher J-L, Lacronique-Gazaille C, Frébet E, et al. « 6 markers/5 colors » extended white blood cell differential by flow cytometry. *Cytometry A.* 2007 ; 71 : 934-44.
84. Orfao A, Schmitz G, Brando B, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin. Chem.* 1999 ; 45 : 1708-17.
85. Grimaldi E, Carandente P, Scopacasa F, et al. Evaluation of the monocyte counting by two automated haematology analysers compared with flow cytometry. *Clin. Lab. Haematol.* 2005 ; 27 : 91-7.
86. Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y, et al. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry.* 2000 ; 42 : 371-8.

87. Hübl W, Andert S, Erath A, et al. Peripheral blood monocyte counting: towards a new reference method. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1995 ; 33 : 839-45.
88. Brando B, Barnett D, Janossy G, et al. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. *European Working Group on Clinical Cell Analysis. Cytometry.* 2000 ; 42 : 327-46.
89. McDunn JE, Hotchkiss RS. Leukocyte phenotyping to stratify septic shock patients. *Crit Care.* 2009 ; 13 : 127.
90. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, et al. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006 ; 130 : 654-61.
91. Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, et al. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2010 ; 60 : 313-9.
92. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, et al. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin. Exp. Immunol.* 2008 ; 154 : 87-97.
93. Nuutila J, Hohenthal U, Laitinen I, et al. Simultaneous quantitative analysis of FcγRI (CD64) expression on neutrophils and monocytes: a new, improved way to detect infections. *J. Immunol. Methods.* 2007 ; 328 : 189-200.
94. Allen E, Bakke AC, Purtzer MZ, et al. Neutrophil CD64 expression: distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections. *Ann. Rheum. Dis.* 2002 ; 61 : 522-5.
95. Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, et al. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin. Exp. Immunol.* 2001 ; 125 : 258-65.
96. Nuutila J. The novel applications of the quantitative analysis of neutrophil cell surface FcγRI (CD64) to the diagnosis of infectious and inflammatory diseases. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2010 ; 23 : 268-74.
97. Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, et al. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine.* 2006 ; 36 : 283-90.
98. Lu B, Gerard NP, Kolakowski LF Jr, et al. Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J. Exp. Med.* 1995 ; 181 : 2271-5.
99. Kaneko T, Stearns-Kurosawa DJ, Taylor F Jr, et al. Reduced neutrophil CD10 expression in nonhuman primates and humans after in vivo challenge with *E. coli* or lipopolysaccharide. *Shock.* 2003 ; 20 : 130-7.
100. Martens A, Eppink GJ, Woittiez AJ, et al. Neutrophil function capacity to express CD10 is decreased in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 1999 ; 27 : 549-53.

101. Williams TE, Ayala A, Chaudry IH. Inducible macrophage apoptosis following sepsis is mediated by cysteine protease activation and nitric oxide release. *J. Surg. Res.* 1997 ; 70 : 113-8.
102. Venet F, Pachot A, Debard A-L, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2006 ; 177 : 6540-7.
103. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2007 ; 81 : 584-92.
104. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993 ; 82 : 3170-6.
105. Sugimoto K, Galle C, Preiser J-C, et al. Monocyte CD40 expression in severe sepsis. *Shock.* 2003 ; 19 : 24-7.
106. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* 2001 ; 166 : 6952-63.
107. Monserrat J, de Pablo R, Reyes E, et al. Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit Care.* 2009 ; 13 : R26.
108. Venet F, Davin F, Guignant C, et al. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock.* 2010 ; 34 : 358-63.
109. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock.* 2002 ; 18 : 487-94.
110. Riccardi F, Della Porta MG, Rovati B, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cells in patients with severe sepsis. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2011 ; 80 : 14-21.
111. Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, et al. Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J. Immunol.* 2003 ; 171 : 909-14.
112. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J. Immunol.* 2002 ; 168 : 2493-500.
113. Hotchkiss RS, Opal S. Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe. *N. Engl. J. Med.* 2010 ; 363 : 87-9.
114. Ayala A, Perl M, Venet F, et al. Apoptosis in sepsis: mechanisms, clinical impact and potential therapeutic targets. *Curr. Pharm. Des.* 2008 ; 14 : 1853-9.
115. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Karl IE. Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis? *Clin. Infect. Dis.* 2005 ; 41 : 465-9.

116. Parrino J, Hotchkiss RS, Bray M. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2007 ; 13 : 191-8.
117. Calandra T, Cohen J. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* 2005 ; 33 : 1538-48.
118. Boussekey N, Cantrel J, Dorchin Debrabant L. Epidemiology, prognosis, and evolution of management of septic shock in a French intensive care unit: a five years survey. *Crit. Care Res. Pract.* 2010 ; 2010 : 436427.
119. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit. Care Med.* 1998 ; 26 : 2078-86.
120. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA.* 1995 ; 274 : 968-74.
121. Wagner C, Deppisch R, Deneffle B, et al. Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the FCgamma receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock.* 2003 ; 19 : 5-12.
122. Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, et al. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 2010 ; 88 : 211-20.
123. Hsu K-H, Chan M-C, Wang J-M, et al. Comparison of Fcγ receptor expression on neutrophils with procalcitonin for the diagnosis of sepsis in critically ill patients. *Respirology.* 2011 ; 16 : 152-60.
124. Heumann D, Glauser MP, Calandra T. Monocyte deactivation in septic shock. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 1998 ; 11 : 279-83.
125. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* 2002 ; 168 : 3536-42.
126. Skinner NA, MacIsaac CM, Hamilton JA, et al. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16+ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 2005 ; 141 : 270-8.
127. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, et al. The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit Care.* 2010 ; 14 : R19.
128. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, et al. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care.* 2009 ; 13 : R119.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	6
SOMMAIRE.....	15
INTRODUCTION	18
GENERALITES	20
1. Le Sepsis.....	21
1.1. Définitions	21
1.2. Epidémiologie	22
1.3. Physiopathologie	24
1.3.1. Réponse immunitaire « normale » à l'infection.....	24
1.3.2. La théorie de l'hyperinflammation	25
1.3.3. La théorie de l'immunosuppression.....	26
1.3.4. Mécanisme de la défaillance d'organe.....	27
1.4. Diagnostic.....	28
1.4.1. Introduction.....	28
1.4.2. Les protéines inflammatoires à la phase aigue	29
1.4.3. Les cytokines	30
1.4.4. Autres médiateurs circulants.....	31
1.5. Facteurs pronostiques	32
1.5.1. Introduction.....	32
1.5.2. Le système PIRO	32
1.5.3. Les scores cliniques	33
1.5.4. Les protéines inflammatoires à la phase aigue	34
1.5.5. Les cytokines	34
1.5.6. Approche génétique	35
2. Intérêt et monitoring de l'immunité.....	36

2.1. Préambule.....	36
2.2. Tests fonctionnels.....	36
2.3. Monitoring cellulaire	37
2.3.1. Les cellules présentatrices d'antigènes : cellules dendritiques et monocytes...	37
2.3.2. Les lymphocytes	38
2.4. Monitoring de l'apoptose cellulaire	39
3. La cytométrie en flux	40
3.1. Définitions	40
3.2. Historique	40
3.3. Principe.....	41
3.4. Avantages et limites	44
3.5. Champs d'application.....	44
3.6. L'immunophénotypage	45
4. Application de l'immunophénotypage étendu des leucocytes au Sepsis	47
4.1. Intérêt et faisabilité.....	47
4.2. Intérêt des marqueurs étudiés	48
4.2.1. Les polynucléaires neutrophiles.....	48
4.2.2. Les monocytes	49
4.2.3. Les lymphocytes	51
4.2.4. Les cellules dendritiques.....	52
4.3. Perspectives d'avenir.....	52
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	54
PATIENTS ET METHODES.....	56
1. Type d'étude.....	57
2. Population étudiée	57
2.1. Critères d'inclusion	57
2.2. Critères d'exclusion.....	58

3. Méthodes	58
3.1. Caractéristiques des patients	58
3.1.1. Données cliniques et biologiques recueillies à l'admission :.....	58
3.1.2. Données bactériologiques recueillies à l'admission et jusqu'au 7ème jour : ..	59
3.1.3. Profil évolutif des patients à 48h, 72h et jusqu'au 7ème jour.....	59
3.2. Revue du dossier des patients : codage	59
3.2.1. Groupes diagnostiques à l'inclusion :	60
3.2.2. Le processus infectieux	60
3.2.3. Profil évolutif des patients durant le suivi	62
3.3. Modalités de l'immunophénotypage leucocytaire	62
3.3.1. Echantillon sanguin, anticorps et cytométrie en flux.....	62
3.3.2. Stratégie de « gating ».....	64
4. Méthodes statistiques	66
4.1. Analyse descriptive	66
4.2. Analyse des paramètres hématologiques.....	66
5. Aspects réglementaires et financiers	66
6. Aspects éthiques	66
RESULTATS	68
1. Schéma de l'étude	69
2. Caractéristiques de la population	70
2.1. Population générale	70
2.1.1. Données épidémiologiques et biologiques.....	70
2.1.2. Données bactériologiques	72
2.2. Comparaison des groupes à l'inclusion.....	74
2.2.1. Données épidémiologiques et biologiques.....	74
2.2.2. Données bactériologiques	76
3. Données hématologiques.....	79

3.1. Populations leucocytaires globales.....	79
3.2. Immunophénotypage leucocytaire : analyse diagnostique.....	79
3.2.1. Comparaison des patients et témoins.....	79
3.2.2. Comparaison des groupes sepsis, sepsis sévère et choc septique à l'inclusion	82
3.3. Immunophénotypage leucocytaire : analyse pronostique	85
3.3.1. Evolution précoce : amélioration/stabilité contre dégradation	85
3.3.2. Evolution au 7ème jour : décédés contre survivants.....	88
3.4. Populations leucocytaires d'intérêt dans l'étude	90
3.5. Exemples de profils cellulaires.....	91
DISCUSSION.....	92
1. Problématique.....	93
2. Caractéristiques de la population	94
3. Données hématologiques : diagnostic et pronostic	96
3.1. Granulocytes immatures et activés.....	96
3.1.1. Population granuleuse activée CD64+	96
3.1.2. Population granuleuse immature CD10-.....	97
3.1.3. Population granuleuse immature CD16dim.....	97
3.2. Population monocytaire.....	98
3.2.1. Monocytes et promonocytes	98
3.2.2. Monocytes pro-inflammatoires CD16+	98
3.3. Les lymphocytes.....	99
3.4. Les cellules dendritiques	100
4. Limites de l'étude	101
5. Points forts de l'étude.....	101
CONCLUSION	103
ANNEXES	105
BIBLIOGRAPHIE	108

TABLE DES MATIERES.....	117
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	122

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Mortalité du Sepsis

Figure 2 : Incidence et mortalité du Sepsis sévère

Figure 3 : Phases pro et anti-inflammatoires au cours du Sepsis d'après Monneret [18]

Figure 4 : Physiopathologie du choc septique d'après Annane [14]

Figure 5 : Mécanisme de la défaillance d'organe d'après Cinel [12]

Figure 6 : Taux de cytokines dans la course du Sepsis

Figure 7 : Le système PIRO [1]

Figure 8 : Cellules dendritiques

Figure 9 : Cellule monocytaire

Figure 10 : Cellules lymphocytaires

Figure 11 : Différents composants d'un cytomètre en flux

Figure 12 : Exemple d'histogrammes mono et biparamétriques

Figure 13 : Exemple de longueur d'onde de différents fluorochromes

Figure 14 : Exemple d'immunophénotypage par cytométrie en flux

Figure 15 : Immunophénotypage de cellules granuleuses

Figure 16 : Immunophénotypage de cellules monocytaires

Figure 17 : Immunophénotypage de cellules lymphocytaires

Figure 18 : Cytomètre en flux Beckman Coulter

Figure 19 : Exemple d'une stratégie de gating isolant les granuleux CD10- pour un témoin

Figure 20 : "Consort" de l'étude

Figure 21 : Sites infectés dans la population globale

Figure 22 : Niveau d'évidence de l'infection

Figure 23 : Gram des germes dans la population globale

Figure 24 : Typage des germes dans la population globale

Figure 25 : Dosage de la CRP et de la PCT

Figure 26 : Origine de l'infection selon les groupes à l'inclusion ($p < 0,001$)

Figure 27 : Niveau d'évidence de l'infection selon les groupes ($p = 0,024$)

Figure 28 : Pourcentage de granuleux immatures et activés selon les groupes à l'inclusion

Figure 29 : Populations lymphocytaires T selon les groupes de gravité à l'inclusion

Figure 30 : Comparaison des cellules dendritiques selon les groupes de gravité

Figure 31 : Pourcentage de granuleux immatures et activés selon l'évolution précoce

Figure 32 : Comparaison des populations lymphocytaires selon l'évolution précoce

Figure 33 : Comparaison des cellules dendritiques selon l'évolution précoce

Figure 34 : Pourcentage de granuleux immatures et activés selon l'évolution à J7

Figure 35 : Expression du marqueur CD16 diminuée lors du Sepsis

Figure 36 : Proportion plus marquée de granuleux CD10- lors du Sepsis

Tableau 1 : Caractéristiques globales de la population

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et biologiques des groupes à l'inclusion

Tableau 3 : Données bactériologiques des différents groupes à l'inclusion

Tableau 4 : Comparaison des cellules granuleuses entre patients et témoins

Tableau 5 : Comparaison des populations monocytaires entre patients et témoins

Tableau 6 : Comparaison des populations lymphocytaires entre patients et témoins

Tableau 7 : Comparaison des cellules dendritiques entre patients et témoins

Tableau 8 : Comparaison des populations monocytaires selon les groupes à l'inclusion

Tableau 9 : Comparaison des populations monocytaires selon l'évolution précoce

Tableau 10 : Comparaison des cellules dendritiques selon l'évolution au 7ème jour

Tableau 11 : Récapitulatif de l'intérêt diagnostique et pronostique des populations

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maitres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maitres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

TITRE :

Intérêts diagnostique et pronostique d'un immunophénotypage leucocytaire étendu par cytométrie en flux à la phase aigüe du Sepsis : étude Septiflux

RESUME :

La cytométrie en flux fournit de nombreuses informations quant à l'état d'activation et de différenciation de nombreuses populations leucocytaires. Ainsi cette technique pourrait être intéressante pour le diagnostic positif et le pronostic du Sepsis à la phase aigüe.

L'objectif de cette étude prospective est d'évaluer l'intérêt diagnostique et pronostique d'un immunophénotypage leucocytaires par cytométrie en flux, à la phase aigüe du Sepsis.

Entre avril 2010 et juin 2011, tous les patients admis au CHU de Limoges pour un Sepsis (défini par au moins 2 critères de SRIS et une infection documentée cliniquement ou bactériologiquement) évoluant depuis moins de 24 heures ont été inclus. Les critères d'exclusion étaient la grossesse, un âge < 18 ans, les cancers et un traitement immunosuppresseur. Selon les définitions de la conférence de consensus les patients étaient répartis en 3 groupes de gravité à l'inclusion: Sepsis, Sepsis sévère et choc septique. Pendant 7 jours suivant l'inclusion, les données cliniques et biologiques étaient colligées. En fonction des défaillances d'organes intervenant dans les 48H, un profil évolutif était attribué. Au plan hématologique, une numération de la formule sanguine était réalisée à l'inclusion ainsi qu'une étude de 30 sous-populations leucocytaires par cytométrie en flux. Les valeurs normales de ces populations ont été déterminées à partir de 50 témoins sains.

178 patients consécutifs ont été inclus (83 Sepsis, 66 Sepsis sévères et 29 chocs septiques pour lesquels ont été observés respectivement 0%, 8 % et 35 % de mortalité). Par rapport aux sujets témoins, la population granuleuse, en particulier la proportion de granuleux immatures et les granuleux activés, était augmentée ainsi que la population monocytaire. Les sous-populations lymphocytaires et dendritiques étaient diminuées confirmant leur intérêt diagnostique. Par ailleurs les variations des granuleux immatures (CD16 dim, CD10-) étaient influencées par le profil évolutif des patients.

Ainsi l'étude de sous-populations leucocytaires (notamment les granuleux immatures) par cytométrie en flux paraît prometteuse pour l'aide au diagnostic et au pronostic du sepsis.

Spécialité Anesthésie-Réanimation

Mots clés : Sepsis – diagnostique – cytométrie en flux – immunophénotypage leucocytaire