

Année 2017/2018

N°

Thèse

Pour le
DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Yonatan PEREZ

Né le 7 mars 1985 à Schiltigheim (67)

LYMPHOCYTES T NON CONVENTIONNELS DANS LES PNEUMONIES GRAVES

Présentée et soutenue publiquement le **19 octobre 2018** devant un jury composé de :

Président : Monsieur le Professeur Pierre-François DEQUIN, Médecine Intensive Réanimation, CHU de Tours ;
Faculté de Médecine de Tours

Membres :

Monsieur le Professeur Dominique PERROTIN, Médecine Intensive Réanimation, CHU de Tours ; Faculté de
Médecine de Tours

Monsieur le Professeur Stéphane EHRMANN, Médecine Intensive Réanimation, CHU de Tours ; Faculté de
Médecine de Tours

Monsieur le Docteur Christophe PAGET, Chargé de recherche INSERM – UMR INSERM 1100

Monsieur le Docteur Mustapha SI-TAHAR, Directeur de recherche INSERM – UMR INSERM 1100

Monsieur le Docteur Bertrand LIOGER, Médecine Interne, PH, CHU Saint-Louis – Paris

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Youenn JOUAN, Médecine Intensive Réanimation, CHU de Tours

RESUME

Lymphocytes T non conventionnels dans les pneumonies graves

Introduction - Les pneumonies sévères se compliquent fréquemment de Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe (SDRA). La dérégulation de la réponse inflammatoire est un facteur clé dans la transition de la pneumonie vers un SDRA. Des études pré-cliniques ont montré le rôle primordial des lymphocytes T non conventionnels [Mucosal Associated Invariant T cells (MAIT), Lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$), Natural Killer T cells (NKT)] dans les pneumonies et spécifiquement dans le contrôle de la réponse immunitaire pulmonaire. Cependant, les données humaines sont limitées. Nous pensons que l'activation de ces cellules et le contrôle de cette activation doivent être parfaitement régulés pour orchestrer une réponse immunitaire adaptée, et qui n'entraîne pas de dégâts tissulaires majeurs qui aboutiraient à un SDRA.

Méthodes - Nous avons mené une étude prospective monocentrique portant sur des patients hospitalisés en réanimation pour pneumonie (étude « ImPACT »). A partir de prélèvements sanguins et respiratoires, nous avons analysé, par des techniques de cytométrie en flux : (1) leur fréquence à différents temps durant l'hospitalisation, (2) la présence de marqueurs d'activation/régulation (*e.g.* CD69 et PD-1), (3) leur capacité de production de cytokines.

Résultats – 26 patients ont été inclus jusqu'à présent et leurs données ont été comparées à celles de volontaires sains. La moitié des patients présentaient un SDRA et l'IGS II médian était de 35,5 (30-51). Nous avons retrouvé une baisse significative et majeure des MAIT et, dans une moindre mesure, des NKT, dans le sang chez les patients du groupe «Pneumonie» comparé aux volontaires sains. Nous n'avons pas observé de variations significatives de fréquence des LT $\gamma\delta$. Cette diminution importante de la fréquence des MAIT pourrait être liée à un recrutement au site inflammatoire car nous avons pu mettre en évidence une proportion élevée de MAIT dans les aspirations trachéales de certains patients en SDRA. Une forte proportion des MAIT avait par ailleurs un phénotype CD69⁺-PD1⁺. La proportion de MAIT CD69⁺ diminuait chez les patients ayant une bonne évolution clinique tandis que la proportion de MAIT PD1⁺ restait stable. Après stimulation *ex-vivo*, la proportion de MAIT producteurs d'IFN- γ était plus basse chez les patients porteurs de pneumonie que chez les volontaires sains. Aucune différence n'était notée concernant la proportion de MAIT produisant de l'IL-17 et du TNF- α .

Conclusion - Les MAIT semblent être particulièrement impliquées dans les pneumonies sévères : elles sont recrutées, activées et présentent une sécrétion cytokinique altérée au cours des pneumonies graves. Ces données préliminaires justifient la poursuite d'une analyse approfondie des fonctions des MAIT chez les patients porteurs de pneumonie, en corrélation avec l'état clinique.

Mots clés : pneumonie, syndrome de détresse respiratoire aigüe, lymphocytes T non conventionnels, immunité innée

ABSTRACT

Implication of unconventional T cells during severe pneumonia

Introduction - Severe pneumonia is frequently associated with acute respiratory distress syndrome (ARDS). Uncontrolled inflammatory response in the lung is a key factor in the transition from pneumonia to ARDS. However, the underlying mechanisms are still poorly understood. To assess this, a heterogeneous population of T lymphocytes called “unconventional T cells” (UTC) deserves greater attention. These cells comprise Natural Killer T (NKT) cells, mucosal-associated invariant T cells (MAIT) and $\gamma\delta$ T cells. Pre-clinical studies have shown their versatile properties and their key role in immune responses against invading pathogens. Thus, we hypothesize that a tight regulation of their functions is mandatory to fine-tune the host inflammatory response in the infected lungs, and, subsequently to prevent emergence of an aberrant response leading to tissue damages. Despite this strong rationale, human data are however lacking.

Methods – Single-center prospective study on patients hospitalized in intensive care for severe pneumonia (“ImPACT” study). From blood and respiratory samples, we performed a flow cytometry-based analysis of these cells in order to determine: (1) their frequency at different time-points during hospitalization, (2) the presence of activating/regulating markers (CD69 and PD-1), (3) their ability to produce cytokines involved in ARDS pathogenesis.

Results - 26 patients have been included to date, that were compared to healthy controls. Half of the patients presented ARDS, and median SAPSII was 35.5 (30-51). In patients with severe pneumonia, we observed a striking decrease in circulating MAIT cells and, and, more moderately for NKT, compared to healthy controls. We did not find any significant variation for $\gamma\delta$ T blood frequency. This observation may suggest a recruitment of these cells to inflammatory site since a high proportion of MAIT cells can be detected in respiratory fluids of some patients with ARDS. In addition, circulating MAIT cells of patients expressed high levels of CD69 and PD-1. Interestingly, the proportion of CD69⁺ MAIT cells decreased with clinical improvement, while proportion of PD-1⁺ remained stable. Upon *ex-vivo* stimulation, proportion of IFN- γ -producing MAIT cells was significantly decreased in patients, compared to healthy controls, while proportions of IL-17 and TNF- α -producing MAIT cells were similar.

Conclusion – MAIT cells are recruited, activated and have an altered cytokine profile secretion during severe pneumonia. These preliminary data justify pursuing in-depth analysis of MAIT cell functions in patients, in correlation with clinical condition.

Key words : pneumonia, acute respiratory distress syndrome, unconventional T cells, innate immunity

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Pr Henri MARRET

ASSESEURS

Pr Denis ANGOULVANT, *P dagogie*
Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Pr Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Universit *
Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Pr Patrick VOURC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

Mme Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Pr Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Pr Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972
Pr André GOUAZE - 1972-1994
Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON
Pr Philippe ARBEILLE
Pr Catherine BARTHELEMY
Pr Christian BONNARD
Pr Philippe BOUGNOUX
Pr Alain CHANTEPIE
Pr Pierre COSNAY
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr Lo c DE LA LANDE DE CALAN
Pr Alain GOUDEAU
Pr No l HUTEN
Pr Olivier LE FLOCH
Pr Yvon LEBRANCHU
Pr Elisabeth LECA
Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ
Pr Gérard LORETTE
Pr Roland QUENTIN
Pr Alain ROBIER
Pr Elie SALIBA

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – J.C. BESNARD – P. BEUTTER – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUAZE – J.L. GUILMOT – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – E. LEMARIE – G. LEROY – Y. LHUINTE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAIN – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian.....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique.....	Cardiologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle.....	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe.....	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora.....	Pharmacologie clinique
BERNARD Anne.....	Cardiologie
BERNARD Louis.....	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
BODY Gilles.....	Gynécologie et obstétrique
BONNET-BRILHAULT Frédérique.....	Physiologie
BRILHAULT Jean.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent.....	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck.....	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent.....	Psychiatrie d'adultes
CHANDENIER Jacques.....	Parasitologie, mycologie
COLOMBAT Philippe.....	Hématologie, transfusion
CORCIA Philippe.....	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe.....	Radiologie et imagerie médicale
DE TOFFOL Bertrand.....	Neurologie
DEQUIN Pierre-François.....	Thérapeutique
DESOUBEAUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe.....	Anatomie
DIOT Patrice.....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague.....	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri.....	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
DUMONT Pascal.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
EL HAGE Wissam.....	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan.....	Réanimation
FAUCHIER Laurent.....	Cardiologie
FAVARD Luc.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand.....	Gériatrie
FOUQUET Bernard.....	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle.....	Anatomie & cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOGA Dominique.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
GOUPILLE Philippe.....	Rhumatologie
GRUEL Yves.....	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice.....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUYETANT Serge.....	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel.....	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier.....	Urologie
HALIMI Jean-Michel.....	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier.....	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis.....	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
LABARTHE François.....	Pédiatrie
LAFFON Marc.....	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique.....	Bactériologie-virologie
LAURE Boris.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry.....	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel.....	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude.....	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent.....	Dermato-vénérologie
MAILLOT François.....	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain.....	Pneumologie

MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel	Dermatologie-vénérologie
MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis	Rhumatologie
ODENT Thierry	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna	Gynécologie-obstétrique
PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Dominique	Réanimation médicale, médecine d'urgence
PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
PLANTIER Laurent	Physiologie
REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénérologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
TOUTAIN Annick	Génétique
VAILLANT Loïc	Dermato-vénérologie
VELUT Stéphane	Anatomie
VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé	Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien	Soins palliatifs
POTIER Alain	Médecine Générale
ROBERT Jean	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

BAKHOS David	Physiologie
BARBIER Louise	Chirurgie digestive
BERHOUET Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERTRAND Philippe	Biostat., informatique médical et technologies de communication
BRUNAUT Paul	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CLEMENTY Nicolas	Cardiologie
DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane	Biophysique et médecine nucléaire
FAVRAIS Géraldine	Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe	Néphrologie
GOUILLEUX Valérie	Immunologie
GUILLON Antoine	Réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille	Immunologie
IVANES Fabrice	Physiologie
LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste	Radiologie pédiatrique
PIVER Éric	Biochimie et biologie moléculaire

REROLLE Camille.....Médecine légale
ROUMY JérômeBiophysique et médecine nucléaire
SAUTENET BénédicteNéphrologie
TERNANT David.....Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
ZEMMOURA IlyessNeurochirurgie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....Neurosciences
BOREL Stéphanie.....Orthophonie
DIBAO-DINA ClarisseMédecine Générale
MONJAUZE CécileSciences du langage - orthophonie
PATIENT Romuald.....Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET CécileMédecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

RUIZ Christophe.....Médecine Générale
SAMKO Boris.....Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ AyacheDirecteur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
CHALON SylvieDirecteur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
COURTY YvesChargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY HuguesChargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
ESCOFFRE Jean-Michel.....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
GILOT Philippe.....Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GUILLEUX FabriceDirecteur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7001
GOMOT Marie.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice.....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER FrédéricChargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
LE PAPE AlainDirecteur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
MAZURIER Frédéric.....Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
MEUNIER Jean-ChristopheChargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
PAGET ChristopheChargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL WilliamChargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
SI TAHAR MustaphaDirecteur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

DELORE ClaireOrthophoniste
GOUIN Jean-Marie.....Praticien Hospitalier
PERRIER DanièleOrthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

LALA EmmanuellePraticien Hospitalier
MAJZOUB Samuel.....Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

BIRMELE Béatrice.....Praticien Hospitalier

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans 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 le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Docteur Youenn Jouan : merci pour ton encadrement hors pair durant toute cette année. J'ai beaucoup appris à tes côtés depuis la réanimation 3 jusqu'aux paillasses du CEPR. A n'en pas douter, tu as été une des personnes qui ont déterminé ma décision de devenir réanimateur. J'ai admiré ta ténacité et ta persévérance. J'espère que cette collaboration sera le début d'une longue série.

A Monsieur le Docteur Christophe Paget : merci pour ton enseignement et tes conseils durant cette année de découverte de la recherche.

A Monsieur le Docteur Mustapha Si-Tahar : merci de m'avoir accueilli au CEPR. Merci pour ta bienveillance.

A Monsieur le Professeur Dominique Perrotin : j'ai grandement apprécié votre érudition et votre exigence de tous les instants. J'ai entendu de nombreuses phrases au staff du matin qui resteront longtemps gravées dans ma mémoire. Le choix est difficile bien sûr mais si je ne devais en retenir qu'une, ce serait sans doute : « L'honneur de notre métier est notre responsabilité. »

A Monsieur le Professeur Pierre-François Dequin : merci pour vos conseils avisés et votre enseignement au quotidien dans le service.

A Monsieur le Professeur Stéphane Ehrmann : merci pour ta disponibilité et ton implication dans l'enseignement de notre spécialité.

A Monsieur le Professeur François Maillot : merci de m'avoir fait partager votre passion pour les maladies rares et le diagnostic. Même si je suis sorti des murs de la médecine interne, j'espère bien garder une âme d'interniste.

A Monsieur le Docteur Bertrand Lioger : merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci pour ton aide dans la rédaction de mon mémoire.

Merci à Chloé Boisseau pour m'avoir initié aux manips à mon arrivée au CEPR. En espérant retrouver une voisine de bureau aussi souriante !

Merci à Florent Creusat pour sa disponibilité à toutes les étapes de ce projet.

Merci à toute l'équipe du CEPR pour l'ambiance chaleureuse qui y règne.

Aux infirmières de recherche du service, Mesdames Aurélie Aubrey, Véronique Siméon, Delphine Chartier, merci pour tout le travail que vous avez réalisé pour l'étude ImPACT. Vous êtes un maillon essentiel de cette étude.

A Monsieur le Docteur Antoine Guillon : merci de m'avoir parlé un soir de garde de ton « deuxième métier » et de m'avoir donné envie de le découvrir.

A tous les médecins du service de réanimation, Laetitia Bodet-Contentin, Denis Garrot, Annick Legras, Emmanuelle Mercier, Charlotte Salmon, merci de m'avoir appris tant de choses avec rigueur et bienveillance.

A tous les médecins du service de médecine interne, Adrien Bigot, Alice Bongrani, Elisabeth Diot, Nicole Ferreira, Stéphanie Jobard, Julie Magnan.

A tous les médecins et équipes para-médicales qui m'ont accompagné à Tours, Orléans, Bourges et Angers.

Au Docteur Laurent Aaron qui nous a quitté avant de nous avoir transmis tout son savoir.

A mes amis d'enfance : Ilan, David, David S, Olivier, Yaëlle, Galith, Elie T, Elie G.

A mes amis Strasbourgeois : Yannis et Mélody, Elias, Quentin et Sophie, Quentin et Aurélie, Damien et Audrey, Sébastien et Nadège.

A mes amis colombiens : Nathaniel, David, Rudy, Yaniv.

A tous mes co-internes qui m'ont accompagné durant ces 10 stages d'internat.

A mes parents qui m'ont transmis la passion de la médecine, l'amour des livres et des contrées lointaines.

A ma sœur Sara pour son soutien indéfectible depuis toujours.

A mon beau – frère Raphaël pour sa joie de vivre !

A mes nièces Lielle et Ava pour leur sourire.

A mes grands-parents, oncles et tantes, cousins et cousines de par le monde.

TABLE DES MATIERES

1.	INTRODUCTION.....	15
1.1.	Pneumonie.....	15
1.2.	Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe.....	16
1.2.1.	Définition.....	16
1.2.2.	Épidémiologie.....	17
1.2.3.	Facteurs de risque.....	18
1.2.4.	Physiopathologie.....	18
1.2.5.	Prise en charge thérapeutique.....	19
1.2.6.	De la pneumonie au SDRA : un continuum immunopathologique a ré-explorer.....	21
1.3.	Lymphocytes T non conventionnels.....	21
1.3.1.	Généralités.....	21
1.3.2.	Natural Killer T cells.....	22
1.3.3.	Mucosal Associated Invariant T cells.....	23
1.3.4.	Lymphocytes T $\gamma\delta$	23
1.3.5.	LTNC et infections respiratoires.....	24
1.3.6.	Hypothèses de travail et objectifs.....	26
2.	METHODES.....	26
2.1.	Conception de l'étude.....	26
2.2.	Inclusion des patients.....	27
2.3.	Critères évalués.....	28
2.4.	Aspects techniques.....	28
2.5.	Recueil des échantillons sanguins.....	29
2.5.1.	Échantillons sanguins.....	29
2.5.2.	Échantillons respiratoires.....	29
2.5.3.	Lavage broncho-alvéolaires.....	29
2.6.	Recueil et gestion des données	29
2.7.	Statistiques.....	30
2.8.	Aspects réglementaires et éthiques.....	30
2.9.	Protocole Expérimental	31
2.9.1.	Sang.....	31
2.9.2.	Aspirations trachéales.....	32

3. RESULTATS.....	33
3.1. Caractéristiques des patients.....	33
3.2. Analyses des LTNC.....	35
3.2.1. Analyse descriptive des taux de LTNC à l'inclusion.....	35
3.2.2. Activation et régulation des LTNC.....	35
3.2.3. Analyse dynamique des LTNC dans le sang.....	38
3.2.4. Analyses fonctionnelles des MAIT dans le sang : production de cytokines après stimulation ex-vivo.....	38
4. DISCUSSION.....	42
5. BIBLIOGRAPHIE.....	47

ABREVIATIONS

Ags : Antigène

AT : Aspiration Trachéale

CD : Cluster de Différentiation

CEPR : Centre d'Etudes des Pathologies
Respiratoires

CMH : Complexe Majeur
d'Histocompatibilité

DAMP : Damage Associated Molecular
Pattern

e.g. : *exempli gratia*

EDTA : acide éthylène diamine tétra -
acétique

i.e. : *id est*

IGS II : Indice de Gravité Simplifié II

IL : Interleukine

LBA : Lavage Broncho - Alvéolaire

LT $\gamma\delta$: Lymphocytes T $\gamma\delta$

LTNC : Lymphocytes T Non Conventionnels

MAIT : Mucosal Associated Invariant T cells

MIR : Médecine Intensive – Réanimation

mmHg : millimètres de mercure

NKT : Natural Killer T cells

PAC : Pneumonie Aigue Communautaire

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PAVM : Pneumonie Acquis sous Ventilation Mécanique

PBS : Phosphate Buffered Saline

PD-1 : Programmed Cell Death protein 1

PEP : Pression Expiratoire Positive

PNN : Polynucléaire Neutrophile

PRR : Pathogen Recognition Receptor

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue

SOFA : Sequential Organ Failure Assessment

TCR : T Cell Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TTCd1d : Tétramère Cd1d

TTMR1 : Tétramère de la molécule MR1 (MHC I - related gene protein 1)

WT : Well Type

1. INTRODUCTION

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité physique et fonctionnelle des tissus et organes face aux agressions. Ces agressions peuvent être infectieuses, mais aussi physiques. L'inflammation est le processus immunitaire déclenché en réaction à ces agressions qui va viser à 1/ contenir ou éradiquer la source de l'agression et 2/ restaurer l'intégrité et la fonction des tissus lésés (1). L'agression d'origine infectieuse est donc une cause majeure de déclenchement de la réponse inflammatoire. C'est l'association entre une agression infectieuse et le déclenchement d'une réponse inflammatoire en réponse à sa détection qui constitue une « infection », au sens clinique du terme. Les agressions infectieuses sont particulièrement fréquentes au niveau des sites dit « barrières », les muqueuses, qui sont en contact avec les pathogènes de l'environnement. A ce titre, les infections pulmonaires (ou pneumonies) sont donc une cause extrêmement fréquente d'infection dans le monde (2).

1.1. Pneumonie

La pneumonie est définie par une infection du parenchyme pulmonaire par un micro-organisme (bactérie, virus, champignon). Une pneumonie aigue communautaire (PAC) est définie comme une pneumonie acquise en dehors d'une structure de soins.

Le diagnostic repose sur l'association d'une symptomatologie respiratoire basse aiguë et la présence d'images radiologiques compatibles (ou l'apparition de nouvelles images) (3). Les signes généraux sont la fièvre, la tachycardie et la tachypnée. Les signes fonctionnels associent dyspnée, toux et expectorations. L'examen physique peut retrouver des anomalies auscultatoires (râles crépitants, souffle tubaire). La radiographie thoracique est essentielle pour affirmer le diagnostic de pneumonie. Il s'agit classiquement d'un aspect d'opacités alvéolaires avec bronchogramme aérique pouvant être systématisé à un lobe, multilobaire ou diffus. La biologie peut montrer une hyperleucocytose comme une leucopénie.

La gravité clinique des PAC peut grandement varier d'un patient à l'autre, essentiellement en fonction des comorbidités et de l'âge, du -ou des- germe(s) en cause, du degré d'atteinte du parenchyme pulmonaire, et de la survenue ou non de complications aiguës. Ainsi, une PAC simple chez un patient jeune sans comorbidité peut être traitée en ambulatoire, mais la présence de signes de sévérité même modérés et/ou la fragilité du patient vont fréquemment conduire à une hospitalisation. Les données épidémiologiques récentes font état d'une

incidence annuelle de PAC hospitalisées de 25 cas pour 10000 personnes adultes. Parmi ces hospitalisations pour PAC, 21% vont nécessiter une admission en réanimation du fait de la gravité du tableau (4). Chez ces patients admis en réanimation, la mortalité hospitalière est proche de 25% (5). Ce sont souvent les complications aiguës qui font la gravité, imposant l'admission en réanimation : le sepsis/choc septique et le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA). Ces deux entités cliniques ont un dénominateur physiopathologique commun : une dérégulation de la réponse de l'hôte face à l'agression infectieuse initiale. Ainsi, dans les deux cas, la réponse inflammatoire déclenchée après la détection de l'invasion du pathogène est dérégulée, et responsable de dommages tissulaires : au sein des poumons au cours du SDRA (6) et dans les organes à distance au cours du sepsis (7).

Concernant les germes le plus souvent en cause dans les PAC, *Streptococcus pneumoniae* est de loin la bactérie la plus fréquemment isolée en réanimation (28.6%) suivie par *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa* (5). Sur les données les plus récentes, la prévalence des virus est revue à la hausse. Sur une série rétrospective de pneumonies ventilées de façon mécanique, (8), il est retrouvé plus de 20% d'infections virales isolées et plus de 45% de co-infections bactérie/virus.

1.2. Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

1.2.1. Définition

Le SDRA est une forme d'insuffisance respiratoire aiguë secondaire à des lésions pulmonaires diffuses aboutissant à un œdème pulmonaire dit « lésionnel ». Cet œdème est causé par une atteinte de la barrière alvéolo-capillaire d'origine inflammatoire ; l'agression causale pouvant être d'origine pulmonaire ou extra - pulmonaire. Depuis sa description initiale (9), il y a plus de 50 ans, sa définition a évolué.

Les critères diagnostiques les plus récents sont les critères de Berlin (10) comportant 4 éléments :

- Temps : le délai entre la survenue de l'évènement clinique potentiellement responsable de SDRA et le diagnostic de SDRA doit être inférieur à 7 jours
- Imagerie thoracique : la radiographie thoracique (ou le scanner) doivent montrer des opacités bilatérales non expliquées entièrement par des épanchements, des nodules ou des atélectasies

- Origine de l'œdème : l'insuffisance respiratoire ne doit pas être expliquée entièrement par une insuffisance cardiaque ou une surcharge hydrosodée. En l'absence de facteur de risque identifié, une évaluation objective est nécessaire (échographie cardiaque par exemple) afin d'exclure un œdème pulmonaire hydrostatique.
- Oxygénation : le diagnostic de SDRA ne s'envisage que chez un patient ventilé de façon mécanique. Un niveau de PEP (pression expiratoire positive) minimal de 5 cmH₂O est requis. La profondeur de l'hypoxémie évaluée par le rapport entre la pression partielle d'oxygène et la fraction inspirée d'oxygène définit 3 classes de sévérité :
 - Léger : $200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$
 - Modéré : $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$
 - Sévère : $\leq 100 \text{ mmHg}$

1.2.2. Epidémiologie

Les données les plus récentes concernant l'épidémiologie du SDRA en réanimation proviennent de l'étude LUNG SAFE publiée en 2016 (11). Cette étude observationnelle de grande ampleur (459 réanimations dans le monde) a mis en évidence qu'un patient sur 10 en réanimation a les critères de SDRA, et que 23% des patients ventilés de façon mécanique vont développer un SDRA. Parmi les patients en insuffisance respiratoire aiguë, la grande majorité de ceux qui vont évoluer vers un SDRA le font de façon précoce (93% lors du premier ou du deuxième jour). L'étude a confirmé que la mortalité hospitalière est corrélée à la sévérité du SDRA. Ainsi, selon le stade de sévérité (léger, modéré, sévère), elle est respectivement de 35%, 40% et 46%, soit une mortalité globale de 40%.

Malgré sa sévérité et sa fréquence dans les services de réanimation, le SDRA reste sous-diagnostiqué : seuls 60% des patients présentant des critères de SDRA sont reconnus par les cliniciens en charge et lorsqu'ils le sont, le diagnostic est souvent retardé.

Au-delà de la mortalité majeure associée à ce syndrome, les patients survivant à un SDRA peuvent développer des séquelles à long terme qui dépassent largement la sphère respiratoire : neuromyopathie de réanimation, diminution des capacités à l'exercice, troubles cognitifs, troubles de l'humeur (12) (13) .

1.2.3. Facteurs de risque

On distingue classiquement les SDRA liés à une agression pulmonaire directe (pneumonies, inhalation de liquide gastrique, contusion pulmonaire, noyade, inhalation de fumées, intoxication médicamenteuse) des SDRA secondaires à une agression indirecte (sepsis extra-pulmonaire, polytraumatisme, pancréatite, brûlures étendues, transfusion massive). La pneumonie est l'étiologie la plus représentée suivie par les sepsis extra – pulmonaires et les inhalations de liquide gastrique (11).

1.2.4. Physiopathologie

Suite à l'agression initiale, qu'elle soit directe ou indirecte, l'atteinte alvéolo-capillaire va suivre schématiquement 3 phases : la phase exsudative, la phase proliférative et la phase fibrotique (14).

Durant la **phase exsudative** du SDRA, la membrane alvéolo-capillaire va subir des dommages causés par des cellules de l'immunité innée présentes sur place ou recrutées depuis le compartiment vasculaire. En effet, ces cellules vont être activées par la reconnaissance de « motifs de danger » dans le milieu, par l'intermédiaire de récepteurs innés ou « PRR » (Pattern Recognition Receptors). Ces motifs vont provenir du pathogène (« PAMPs » pour Pathogen Associated Molecular Patterns) mais aussi de l'hôte (« DAMPs » pour Damage Associated Molecular Patterns). Ceci va conduire à la libération de cytokines pro-inflammatoires (*e.g.* TNF- α , IFN- γ , IL-17) et de chimiokines pour ainsi amplifier la réponse inflammatoire en recrutant notamment des acteurs cellulaires précoces comme les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les monocytes. Bien que la présence des PNN soit indispensable à la défense de l'hôte contre les micro-organismes, leur accumulation et leur activation excessives peut contribuer à l'apparition de dommages tissulaires et cellulaires (15), générant de nouveaux des DAMPs qui vont, à leur tour, amplifier la réponse inflammatoire.

Les lésions créées sur la membrane alvéolo-capillaire vont aboutir à l'accumulation d'un liquide riche en protéines (provenant du plasma et du contenu des cellules détruites) dans l'interstitium et les alvéoles pulmonaires. Le surfactant alvéolaire va être endommagé par l'œdème alvéolaire, et sa production va être altérée si les dégâts cellulaires sont importants. L'agglomérat de surfactant lésé et d'œdème riche en protéines forment alors ce qui est nommé sur le plan histologique des « membranes hyalines » dans les espaces alvéolaires. *In*

fine, l'œdème alvéolaire et interstitiel vont ainsi être responsable d'une altération des échanges gazeux et d'une hypoxémie réfractaire. Le compartiment vasculaire est également impliqué, avec une activation de l'endothélium, aboutissant à une augmentation de perméabilité capillaire et la formation de microthrombi disséminés. Ces lésions vasculaires, combinées aux lésions alvéolaires contribuent ainsi conjointement à générer des altérations régionales des rapports ventilation/perfusion.

Durant la seconde phase du SDRA, ou **phase proliférative** vont être initiés des phénomènes de réparation tissulaire. Une matrice provisoire riche en fibrine et en fibronectine se forme le long des membranes basales dénudées. La régénération de la membrane basale alvéolaire est médiée par les pneumocytes de type II. La ré-expression de canaux ioniques sur les pneumocytes de type I et II facilite la résorption du liquide. Enfin la résorption de la matrice provisoire est essentielle à la restauration de l'architecture et de la fonction alvéolaire. L'IL-22, notamment, intervient dans la prolifération épithéliale après agression (16).

La phase finale ou **phase fibrotique**, n'est pas observée chez tous les patients. Elle est caractérisée par un échec de réépithélialisation de la membrane basale alvéolaire et un défaut de production du surfactant. La prolifération de fibroblastes mène finalement à une fibrose interstitielle et intra-alvéolaire. Celle-ci est associée à une surmortalité.

1.2.5. Prise en charge thérapeutique

En dehors du traitement de la pathologie causale si elle est connue, et lorsqu'un traitement existe, la ventilation mécanique est l'élément central de la prise en charge du SDRA.

Le premier objectif est de limiter les lésions induites par la ventilation mécanique. Celles-ci sont regroupées sous le terme VILI (Ventilator-Induced Lung Injury). Lors de chaque insufflation, le volume courant se distribue prioritairement dans les zones les plus compliantes (la compliance reflétant les propriétés élastiques du système respiratoire). Cette distribution inhomogène risque de léser le parenchyme pulmonaire encore sain en induisant une surdistension. Les phénomènes d'ouverture-fermeture répétés des voies aériennes distales (« atelectrauma») sont également délétères. Enfin, la ventilation peut influencer la libération de médiateurs qui vont amplifier la réponse inflammatoire (« biotrauma ») (17).

Depuis le début des années 2000, il est établi qu'une ventilation dite « protectrice » utilisant des volumes courants réduits de l'ordre de 6mL/kg de poids théorique permet de réduire la mortalité et le nombre de jours de ventilation des patients en SDRA (18).

L'utilisation de niveaux élevés de pression expiratoire positive (PEP), chez les patients présentant des SDRA modérés ou sévères permet également de réduire la mortalité et la durée de ventilation (19).

L'utilisation de curares permet, de par la paralysie musculaire qu'elle induit, d'améliorer la mécanique ventilatoire, d'améliorer l'oxygénation et de réduire les lésions induites par la ventilation mécanique. Les curares ont également un impact sur la mortalité et la durée de ventilation (20).

Un autre axe de traitement consiste à placer les patients en décubitus ventral, cette manœuvre permettant d'augmenter le recrutement pulmonaire dans les régions postérieures, de diminuer le shunt intra-pulmonaire et ainsi d'améliorer l'oxygénation. Le recours au décubitus ventral permet de réduire la mortalité dans le groupe des patients les plus graves (SDRA modérés et sévères) (21).

Sur les dernières décennies, de nombreux traitements pharmacologiques ont été évalués.

L'utilisation de Salbutamol intra – veineux avait montré chez les patients en SDRA une réduction de l'eau pulmonaire extra – vasculaire (22). L'essai randomisé visant à évaluer son impact sur la mortalité a été stoppé précocement du fait d'une surmortalité dans le groupe Salbutamol (23). Le facteur de croissance des kératinocytes, utilisé dans l'hypothèse d'une amélioration de la réparation épithéliale, s'est montré délétère en terme de durée de ventilation et de mortalité (24).

Plusieurs essais ont tenté des stratégies d'immunomodulation. L'acide acétylsalicylique, utilisé chez des patients à risque n'a pas montré de diminution d'incidence du SDRA ou de la mortalité (25). La Rosuvastatine (26) et la Simvastatine (27) n'ont montré aucune amélioration clinique chez les patients en SDRA.

Plusieurs études ont évalué l'utilisation des corticoïdes avec différentes stratégies (préventif / curatif, faibles / fortes doses, intervention précoce / tardive) (28) (29). Les résultats sont contradictoires et l'utilisation des corticoïdes n'est pas intégrée aux recommandations les plus récentes (30).

Au final, de nombreuses molécules, malgré un rationnel physiopathologique fort et des données pré – cliniques solides ont échoué à montrer un bénéfice sur la mortalité et seuls les progrès du traitement symptomatique ont permis de réduire la mortalité du SDRA (31).

1.2.6. De la pneumonie au SDRA : un continuum immunopathologique à ré-explorer

Une des explications avancée pour comprendre l'échec des essais portant sur des traitements immunomodulateurs est l'hétérogénéité des patients présentant un SDRA inclus dans ces études. Ainsi, du fait de la définition clinique du SDRA, des patients ayant des étiologies très différentes ont été traités et analysés.

La pneumonie étant le plus grand pourvoyeur de SDRA, il paraît logique de s'intéresser au *continuum* classique existant entre ces deux entités, car 1/ c'est une réalité clinique quotidienne, 2/ cela confère une plus grande cohérence dans l'étude des mécanismes immunopathologiques en jeu dans le développement du SDRA.

Cependant, il apparaît important de ré-aborder ce *continuum* physiopathologique avec des hypothèses et des concepts nouveaux et pertinents. Les récents progrès en immunologie fondamentale (notamment en immunité des muqueuses) nous fournissent des pistes qui doivent être explorées pour nos questions cliniques.

Lors d'une infection, l'enjeu pour l'hôte est de mettre en œuvre une réponse inflammatoire régulée à la fois en intensité et dans le temps, afin de contenir le pathogène tout en évitant la survenue de dommages tissulaires trop importants. Dans le cadre de la pneumonie sévère évoluant vers le SDRA, c'est donc justement cette réponse inflammatoire qui est dérégulée. Les acteurs impliqués, *in fine*, dans la genèse des dégâts sont relativement bien connus (cf. paragraphe 1.2.4), mais cela ne permet pas de comprendre comment se fait la transition vers un SDRA. Il faut donc s'intéresser, pour cela, aux acteurs cellulaires qui ont pour rôle d'orchestrer au sein du poumon la réponse immunitaire et qui sont activés au cours des premières heures et des premiers jours d'une agression infectieuse. Il s'agit là de caractéristiques typiques des Lymphocytes T dits « Non Conventionnels ».

1.3. Lymphocytes T non conventionnels (32) (33)

1.3.1. Généralités

La majorité des connaissances concernant les lymphocytes T concerne les lymphocytes T reconnaissant des peptides présentés par des molécules classiques du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les molécules du CMH sont hautement polymorphes et peuvent présenter une grande variété de peptides. Les récepteurs des lymphocytes T (TCR) présentent également une grande diversité ($> 10^{15-20}$). Maintenir une grande diversité parmi les cellules T naïves a un coût : le nombre absolu de lymphocytes T circulants spécifiques d'un antigène

(Ag) donné est faible. Par ailleurs, les lymphocytes T ne confèrent pas de protection immédiate. Après la rencontre avec un Ag, il faudra plusieurs jours pour obtenir des clones spécifiques d'un Ag donné. En revanche, après une première rencontre avec un Ag, ces cellules T devenues mémoires seront à même d'apporter une réponse plus rapide et plus intense.

Toutefois, certaines populations de lymphocytes T ne correspondent pas à ces caractéristiques. Différentes dénominations sont retrouvées dans la littérature : « lymphocytes T non conventionnels » ou encore « lymphocytes T innate-like ». Cette famille de lymphocytes T représente une niche unique dans le système immunitaire, à l'interface entre immunité innée et adaptative.

Nous utiliserons dans la suite de notre exposé le terme de « Lymphocytes T Non Conventionnels » (LTNC). Ces lymphocytes T sont dits « non conventionnels » par opposition aux lymphocytes T classiques pour plusieurs raisons. Ils expriment des récepteurs TCR de diversité beaucoup plus limitée. Ils ne reconnaissent pas d'Ags peptidiques classiques mais des molécules longtemps considérées non immunogènes comme les lipides ou certains intermédiaires des grandes voies métaboliques endogènes. Ils sont également en mesure de mettre en œuvre une réponse rapide après l'agression initiale dans un délai se comptant en heures. Ils peuvent s'activer par de multiples voies (activation du TCR, reconnaissance de signaux de danger, liaison de cytokines). Bien que circulants, les LTNC sont retrouvés en grandes proportions dans les tissus non- lymphoïdes notamment la muqueuse respiratoire.

1.3.2. Natural Killer T cells

Les lymphocytes T Natural Killer (NKT) avaient initialement été définis comme des lymphocytes T co – exprimant des protéines habituellement exprimées par les lymphocytes Natural Killer (NK) comme la molécule CD161. Cependant l'expression de marqueurs NK n'est pas suffisante pour définir correctement cette population. La particularité de ces cellules est leur capacité à reconnaître des antigènes (Ags) glycolipidiques présentés par une molécule CD1d. Leur récepteur TCR est constitué d'une chaîne α invariante ($V\alpha 24J\alpha 18$ chez l'Homme) associée à un nombre limité de chaînes β . Chez l'homme, les NKT représentent environ 0.1% des cellules T du sang circulant bien que cette fréquence varie de façon importante d'un individu à l'autre. Suite à une activation, les NKT sont capables de produire de grandes quantités de cytokines immunomodulatrices (en particulier IL-17, TNF α et IFN γ) dans les minutes ou les heures suivant l'entrée d'un pathogène dans l'organisme. Ils peuvent

avoir une activité cytotoxique anti-tumorale ou anti-virale. Ils sont également capables 1/ de favoriser la présentation de l'Ag aux lymphocytes T conventionnels en favorisant la maturation notamment des cellules présentatrices d'Ags professionnelles comme les cellules dendritiques, 2/ de trans-activer les cellules NK et 3/ de favoriser la réponse des lymphocytes B.

1.3.3. Mucosal Associated Invariant T cells

Les Mucosal Associated Invariant T cells (MAIT) portent un TCR constitué d'une chaîne α invariante (V α 7.2J α 33) et d'une chaîne β variable (mais dont le répertoire est limité). Ils représentent autour de 5% des cellules T totales circulantes. Leur nom dérive de leur lieu de découverte dans la muqueuse intestinale.. Via leur TCR, ils reconnaissent des Ags présentés par le MR1, une protéine apparentée au CMH de classe I. Les ligands du MR1 incluent des dérivés de la vitamine B9 (folate) et des dérivés instables de la voie de synthèse de la vitamine B2 (riboflavine). Les pathogènes pouvant activer les MAIT via leur TCR ont tous une voie de synthèse de la riboflavine fonctionnelle. Ainsi, les MAIT peuvent répondre de façon TCR-dépendante à de nombreuses bactéries et levures mais pas aux virus. De par leur nature hybride, les MAIT peuvent toutefois s'activer en réponse à des signaux innés (cytokines activatrices) sans nécessité d'une activation concomitante de leur TCR. Ainsi, il est probable que l'activité anti-infectieuse des MAIT puisse également s'étendre aux virus. Après activation, les MAIT produisent diverses cytokines anti-infectieuses comme le TNF- α , l'INF- γ et IL-17, cytokines dont nous avons décrit l'importance dans l'amplification de la réponse inflammatoire au niveau de la muqueuse respiratoire dans le SDRA.

1.3.4. Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) possèdent un récepteur TCR formé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ générées par recombinaison V(D)J. Le nombre de segments V, D et J est plus limité que pour les récepteurs $\alpha\beta$. Ils représentent autour de 5% des lymphocytes T circulants chez l'homme. Il existe plusieurs sous-types de LT $\gamma\delta$. Les LT $\gamma\delta$ TRDV2⁺TRGV9⁺ représentent la population la plus abondante dans le sang chez l'homme. Ils reconnaissent différents antigènes, notamment des phosphoantigènes, et pour d'autres sous-populations particulières, la phycoérythrine et des glycolipides. Leur activation peut être médiée par des molécules apparentées au CMH (CD1d, CD1c, MICA) ou non apparentées au CMH (glycoprotéines

virales). Leurs fonctions sont multiples : cytotoxicité (via la production de granzyme notamment), production de cytokines (TNF α , INF γ , IL-17) et chimiokines.

1.3.5. LTNC et infections respiratoires

Les données expérimentales disponibles à ce jour démontrent, dans différents modèles, un rôle clé des LTNC dans les infections respiratoires. Ces cellules exercent ainsi leur rôle dans la défense anti-infectieuse par la production de cytokines, le recrutement de PNN et de macrophages et par une activité cytotoxique (34).

Les modèles ou les données sont les plus importantes sont la tuberculose, le pneumocoque et la grippe.

Les expérimentations sur modèle murin d'infection tuberculeuse mettent en évidence une activation des NKT sans pour autant que ceux – ci semblent jouer un rôle majeur dans la résolution de l'infection. Ils peuvent toutefois représenter une cible thérapeutique intéressante. En effet, dans un modèle murin d'infection tuberculeuse, l'activation pharmacologique des NKT permet de prolonger la survie des souris (35). Les MAIT interviennent dans le contrôle de la croissance bactérienne à la phase précoce (36). Les LT $\gamma\delta$, via leur production d'IL-17, jouent un rôle essentiel dans la formation des granulomes (37).

Les souris mutées déficientes en NKT ont une mortalité accrue aux infections à *Streptococcus pneumoniae* ; elles présentent une charge bactérienne plus importante comparées à des souris Well Type (WT). Cette protection est en lien avec la production d'IFN- γ régulant le recrutement précoce de PNN (38). L'activation exogène des NKT protège de l'infection à *Streptococcus pneumoniae* (39). Dans un modèle murin d'infection pneumococcique, durant la phase de résolution de l'inflammation faisant suite à la clairance bactérienne : le nombre de LT $\gamma\delta$ est très augmenté (>30 fois) dans le poumon et ceux - ci interviennent dans la régulation des macrophages alvéolaires (40).

Dans des modèles murins d'infection grippale, les souris mutées déficientes en NKT ont une susceptibilité accrue à l'infection. L'activation exogène des NKT est protectrice. Les NKT permettent de limiter les lésions tissulaires pulmonaires en limitant le recrutement de monocytes au site inflammatoire (41).

Chez l'homme, l'importance de ces populations dans la défense contre l'infection a pu être mise en évidence dans différents travaux.

Chez les patients présentant une tuberculose pulmonaire active, les quantités circulantes de NKT sont réduites comparé à des patients exposés ou des volontaires sains. Cette diminution est toujours observée 6 mois après l'initiation du traitement antituberculeux (42). Des résultats comparables sont retrouvés pour les MAIT avec une franche diminution des cellules circulantes chez les patients présentant une tuberculose active (43). Dans une série de 27 patients porteurs de tuberculose pulmonaire active : les LT $\gamma\delta$ sont la principale source d'IL-17 et la proportion de LT $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 est augmentée comparé à des volontaires sains (44).

Des travaux menés en réanimation sur des patients admis pour sepsis ont retrouvé une fréquence diminuée des MAIT (45) et des LT $\gamma\delta$ (46) à la phase initiale de la prise en charge. Dans une série de 16 patients hospitalisés pour pneumonie grippale (H7N9), la fréquence des MAIT est diminuée chez les patients comparés aux volontaires sains. Parmi les patients, les patients qui survivront à la pneumonie ont une fréquence de MAIT plus élevée que ceux qui en décéderont (47).

Par ailleurs, au-delà de leur implication dans la réponse inflammatoire, les mécanismes de régulation des LTNC restent mal connus dans le cadre des infections pulmonaires. Il s'agit pourtant d'un aspect important : une sur-activation et/ou un défaut de régulation pourrait en effet être impliqués dans la survenue d'un SDRA. Il est possible que l'expression de « checkpoints » inhibiteurs à la surface des LTNC régule l'activité de ces cellules. L'induction de ces récepteurs inhibiteurs (*e.g.* PD-1, CTLA4, ...) est en effet connue pour induire un état d'anergie cellulaire comme démontré dans l'inflammation chronique ou encore le cancer (48). Ces données ont pu aboutir au développement de thérapies ciblant ces « checkpoints » en cancérologie.

Toutefois, le potentiel rôle des « checkpoints » inhibiteurs dans la régulation des LTNC est mal connu. Chez l'homme, la tuberculose pulmonaire active est associée à une expression plus importante de PD-1 à la surface des NKT (49) et des MAIT (50). Le blocage de PD-1 permet d'augmenter la prolifération *in vitro* des NKT suite à une stimulation exogène (49). Les MAIT montrent une production accrue d'IFN- γ , après blocage de PD-1 (50).

1.3.6. Hypothèses de travail et objectifs

Les LTNC sont donc des cellules clés dans la régulation de la réponse immunitaire au cours des infections respiratoires. Nous pensons que leur activation et le contrôle de cette activation doivent être parfaitement régulés pour orchestrer une réponse immunitaire adaptée, et qui n'entraîne pas de dégâts tissulaires majeurs qui aboutiraient à un SDRA caractérisé.

Malgré le fort rationnel qui sous-tend ces hypothèses, il n'existe quasiment aucune donnée exhaustive et systématique sur ces populations et leur activation chez l'Homme, au cours des pneumonies sévères et du SDRA.

Nous avons donc mis en place une étude de nature translationnelle, impliquant le service MIR du CHU de Tours et l'unité INSERM U1100 « CEPR » pour explorer les LTNC et leur activation/régulation chez des patients admis en MIR pour pneumonie.

2. METHODES

2.1. Conception de l'étude

Nous avons mené une étude prospective monocentrique portant sur les patients admis pour une PAC dans le service de MIR du CHU de Tours : étude ImPACT « Immunité Innée au cours des Pneumonies Aiguës Communautaires : une approche Translationnelle ». L'étude a été promue par le CHU de Tours, coordonnée par le Dr Youenn JOUAN et s'est déroulée dans le service de MIR du CHU de Tours.

Nous avons constitué un groupe de patients hospitalisés en réanimation pour pneumonie grave (groupe «Pneumonies»). Un groupe de patients «Témoins» consistant en des patients nécessitant le recours à la ventilation mécanique invasive et admis en MIR mais pour un autre motif qu'une pneumonie et n'ayant pas d'état de choc a été constitué. Les interventions diagnostiques, thérapeutiques ou la surveillance n'ont pas été modifiés par rapport à la prise en charge habituelle des patients.

Pour les nécessités de certaines explorations, des analyses ont également été faites sur du sang provenant de volontaires sains, issus des volontaires pour le don du sang (groupe «Volontaires sains»).

L'analyse des paramètres d'intérêt a été faite dans le compartiment sanguin et, pour les patients recevant une ventilation mécanique invasive, au niveau respiratoire (analyse du produit des aspirations trachéales). Compte tenu de l'importance de la dynamique temporelle de la réponse inflammatoire, plusieurs temps d'analyse chez un même patient ont été réalisés. Les analyses ont été faites dans les 24h après l'inclusion, à J3, J8, J15 et le jour de la sortie de réanimation pour les échantillons sanguins, et aux mêmes temps pour les échantillons respiratoires pour les patients sous ventilation artificielle invasive. Il était attendu que certains patients atteints de PAC sévère développent dans les jours suivant le diagnostic un SDRA. Par ailleurs, tous les patients intubés-ventilés sont à risque de développer une pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM), infection nosocomiale la plus fréquente en réanimation, et survenant, par définition, après au moins 48h de ventilation mécanique. Un prélèvement respiratoire et un tube de sang supplémentaires ont donc été prélevés si un SDRA ou une PAVM étaient diagnostiqués en dehors des dates fixées pour les prélèvements.

2.2. Inclusion des patients

- Critères d'inclusion des patients du **groupe « Pneumonies »** :
 - Diagnostic initial de PAC posé sur : la présence d'une toux, d'expectorations sales, de douleur thoracique et/ou de dyspnée (au moins deux critères requis), associé à la présence d'un infiltrat radiologique ou scannographique initialement
 - Diagnostic de pneumonie fait dans les 48h après l'admission à l'hôpital
 - Patient admis à l'hôpital depuis moins de 8 jours

- Critères d'inclusion des patients du **groupe « Témoins »** :
 - Recours à la ventilation mécanique invasive depuis moins de 48h
 - Durée prévisible de ventilation mécanique invasive >48h
 - Patient admis à l'hôpital depuis moins de 8 jours
 - Absence de critère de pneumonie (*i.e.* absence des critères de pneumonie du groupe « Pneumonie »)
 - Absence d'état de choc défini par la nécessité de recours aux amines vasopressives malgré un remplissage par cristalloïdes $\geq 30\text{mL/kg}$, associé à un taux de lactates sanguins $> 2\text{mmol/L}$

- Critères d'exclusion généraux :
 - o Patient sous protection judiciaire
 - o Femmes enceintes ou allaitantes

2.3. Critères évalués

Les paramètres biologiques suivants ont été analysés dans le sang pour tous les patients, et dans les produits des aspirations trachéales pour les patients sous ventilation artificielle invasive:

- Evaluation des fréquences des populations lymphocytaires non conventionnelles (MAIT, $LT\gamma\delta$, NKT) par cytométrie en flux, par rapport aux lymphocytes T totaux (expression en % des cellules $CD3^+$).
- Evaluation de la proportion de cellules présentant le marqueur d'activation CD69 et le marqueur de régulation PD-1
- En fonction des données de fréquence, la capacité de ces cellules à produire les cytokines d'intérêt $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, IL-17 était testée.

Ces données biologiques ont été comparées entre elles dans le temps chez un même patient et corrélées à l'évolution clinique du patient, et comparées aux groupes «Témoins» et «Volontaires sains». L'analyse de ces données a été réalisée au CEPR Inserm U1100.

2.4. Aspects techniques

La cytométrie en flux était la principale technique d'analyse utilisée dans ces travaux. Il s'agit d'une technologie permettant la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule, notamment la taille relative (Forward Scatter), la granulosité ou complexité interne relative (Side Scatter) et l'intensité relative de fluorescence. Le cytomètre comporte une composante fluïdique, une composante optique (production de faisceaux lasers et collecte des signaux) et une composante électronique (conversion de signaux analogiques en signaux numériques).

Après préparation, les cellules sont transportées dans un liquide vecteur jusqu'à une source d'excitation lumineuse, le laser. Le cytomètre va donc pouvoir analyser les propriétés de diffusion du faisceau laser au sein des cellules et leurs capacités à réémettre de la lumière à différentes longueurs d'ondes sous l'effet de cette excitation lumineuse, c'est la fluorescence. La détection spécifique des populations cellulaires se fait par marquage préalable des cellules

par des anticorps couplés à des fluorophores de spectre d'émission connus, qui vont cibler des antigènes d'intérêt permettant de caractériser les cellules.

Chaque fois qu'une cellule passe devant le faisceau laser, la lumière est diffractée puis captée et la lumière produite par fluorescence est également détectée. Le cytomètre comporte une succession de filtres et de miroirs dichroïques permettant de séparer la lumière selon les longueurs d'ondes : c'est ce qui permet la détection des couleurs et donc l'analyse sur différents canaux. La quantité de lumière détectée à chaque canal est ensuite convertie en signal électrique, amplifiée, puis convertie en signal numérique. Un ordinateur stocke toutes ces données pour chaque élément analysé, données qui sont ensuite étudiées via un logiciel d'analyse. La présente étude a été réalisée sur un cytomètre 8 couleurs MACSquant® (Miltenyi Biotec).

2.5. Recueil des échantillons biologiques

2.5.1. Échantillons sanguins

A chaque prélèvement, 5 mL de sang étaient prélevés sur tube EDTA par ponction d'une veine périphérique ou sur cathéter artériel si le patient en était muni.

2.5.2. Échantillons respiratoires

Pour les patients intubés, les aspirations trachéales étaient prélevées au même moment que les échantillons sanguins.

2.5.3. Lavages broncho - alvéolaires

Si une fibroscopie bronchique avec lavage broncho – alvéolaire (LBA) était réalisée chez un patient inclus, le liquide de lavage était également analysé.

2.6. Recueil et gestion des données

Les principales caractéristiques cliniques et paracliniques des patients étaient relevées de façon quotidienne durant le séjour en réanimation.

Il s'agissait : des données démographiques et anthropométriques, des antécédents et comorbidités, des constantes cliniques, des paramètres de ventilation, de la survenue d'un SDRA (et son niveau de sévérité) ou d'une PAVM, des données radiologiques, d'une sélection de variables biologiques pertinentes, de la documentation microbiologique si elle était disponible, des scores IGS II (Indice de Gravité Simplifié II) et SOFA (Sequential Organ Failure Assessment).

Concernant la documentation microbiologique des patients admis pour PAC, la procédure standard interne du service de MIR comportait les techniques suivantes : PCR multiplexe (sur aspiration naso-pharyngée, AT, LBA), culture (sang, AT, LBA), antigénuries Pneumocoque et Légionelle.

Les principales modalités des traitements mis en œuvre étaient également relevées: sédation, curarisation, décubitus ventral, remplissage vasculaire, utilisation de catécholamines, corticothérapie, épuration extra-rénale, antibiothérapie.

Le statut vivant ou décédé était recherché après sortie du service à J28 et J90.

Les données de cytométrie en flux étaient traitées sur les logiciels Venturi One® (v6.0) et Graph Pad Prism® (v6).

2.7. Statistiques

Les données qualitatives sont présentées en nombre (%) et les variables continues en médiane avec le 1^{er} et le 3^{ème} quartile (Q1 – Q3). La significativité statistique est évaluée par le test de Mann – Whitney pour les données non appariées et par le test de Wilcoxon pour les données appariées. Un $p < 0.05$ est considérée comme significatif. Les populations lymphocytaires T non conventionnelles sont évaluées selon leur abondance relative, exprimée en pourcentage des lymphocytes T totaux. Concernant les cytokines d'intérêt, la proportion des sous-populations lymphocytaires produisant ces cytokines est évaluée.

2.8. Aspects réglementaires et éthiques

L'étude ImPACT est considérée comme une Recherche Interventionnelle à risques et contraintes minimales (RIPH-2). Le numéro NCT ClinicalTrial.gov est : nct03379207.

Tous les patients -ou leur proche, en l'absence de possibilité d'obtention du consentement par le patient- ont fourni leur consentement avant l'inclusion dans l'étude. Les patients inclus initialement sur consentement d'un proche ont donné ensuite leur consentement pour la poursuite de l'étude.

L'étude a été approuvée par le Comité de Protection des Personnes Ile-de-France 8.

Les prélèvements sanguins issus des donneurs sains ont été obtenus après consentement du volontaire, dans le cadre d'un don du sang à l'Établissement Français du Sang de Tours, selon une convention établie entre l'EFS et l'Université de Tours.

2.9. Protocole expérimental

2.9.1. Sang

2.9.1.1. Préparation des cellules

Après prélèvement dans le service de MIR, les échantillons sont stockés à 4°C puis transférés au CEPR U1100 où est réalisé l'ensemble des analyses. L'ensemble des étapes de préparation est réalisé dans un laboratoire de niveau de confinement L2 sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II. Afin d'isoler les leucocytes mononucléés (« PBMC » pour Peripheral Blood Mononuclear Cells), le sang total est déposé délicatement sur de l'Histopaque® - 1119 (volume à volume). La préparation est ensuite centrifugée à 800g pendant 30 minutes. L'anneau de cellules (localisé sous le plasma) correspondant aux PBMC est récolté à l'aide d'une micro-pipette et déposé dans un tube Falcon 15 mL complété avec du PBS 1x (Tampon Phosphate Salin). Les PBMC sont lavées via une nouvelle centrifugation. Le culot est ensuite repris dans 300µl de tampon de lyse pendant 1 minute afin d'éliminer les érythrocytes résiduels (Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri – Max). La réaction est stoppée en ajoutant 5 mL de PBS SVF 2%. Après centrifugation, le culot est repris dans 1 mL de PBS SVF 2% EDTA 2mM et conservé à +4°C pour la suite des analyses.

2.9.1.2. Compte au cytomètre

Le comptage des suspensions cellulaires est réalisé sur le cytomètre, sur la base de la taille (FSC) et de la granulosité (SSC) des événements.

2.9.1.3. Phénotypage des cellules

On ajoute 1 million de lymphocytes par puit sur une plaque Falcon 96 puits. Les cellules sont centrifugées à 400g pendant 5 minutes à 4°C. Toutes les centrifugations suivantes sont réalisées dans les mêmes conditions. Les culots cellulaires sont repris dans 50 µl de PBS 2%SVF contenant un panel d'anticorps (Acs) fluorescents permettant de déterminer le type cellulaire et/ou son état d'activation. Les cellules sont incubées avec ces préparations d'Acs pendant 30 min à l'obscurité à 4°C puis lavées. Enfin on reprend les culots dans 200µl de PBS, SVF 2%, EDTA2 mM.

2.9.1.4. Analyse fonctionnelle

2.9.1.4.1. Stimulation des cellules

La préparation initiale des cellules est identique à celle décrite au paragraphe 2.9.1.1. Les cellules sont ensuite centrifugées et les culots repris en solution. Les cellules sont incubées

dans une solution de RPMI SVF 5% comportant du Golgi Plug™ (Brefeldin A, 1/1000^{ème}, BD Biosciences) et du Golgi Stop™ (Monensin, 1/1500^{ème}, BD Biosciences). Ces deux molécules sont des inhibiteurs du transport protéique. Elles vont bloquer le transport protéique intra-cellulaire des cellules et provoquer ainsi l'accumulation des cytokines produites dans l'appareil de Golgi, favorisant ainsi leur détection lors de l'analyse en cytométrie en flux. Les cellules sont stimulées par de la PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma – Aldrich, 100ng/ml) et de la Ionomycine (I0634-1MG, 1µg/mL, Sigma – Aldrich). Une partie des cellules n'est pas stimulée afin de servir de contrôle. L'ensemble de la préparation cellulaire est incubé durant 4h00 à 37°C.

2.9.1.4.2. Marquage membranaire et intra-cellulaire

Après incubation, un marquage membranaire est tout d'abord réalisé comme décrit au paragraphe 2.9.1.3. Ensuite, après centrifugation, les culots sont repris dans 150 µl de Cytoperm™ (1/10^{ème}, BD Biosciences) afin de perméabiliser les cellules et de permettre un marquage intra-cellulaire. Après centrifugation, les culots sont repris dans 200 µl de Cytoperm™. Les cellules sont centrifugées et les culots cellulaires sont repris dans 50 µl de Cytoperm contenant un panel d'anticorps fluorescents pour la détection de nos cytokines d'intérêt. Les cellules sont incubées 20 minutes à l'obscurité à 4°C. Un dernier lavage est réalisé en complétant les puits avec 200µl de PBS SVF 2% et en centrifugeant les cellules. Enfin on enlève le surnageant et on reprend les culots dans 200µl de PBS SVF 2% EDTA 2mM.

2.9.2. Aspirations trachéales

Après prélèvement dans le service de MIR, les échantillons sont stockés à 4°C puis transférés au CEPR U1100 où est réalisé l'ensemble des analyses. L'aspiration trachéale est reprise dans du PBS1x et du DTT. Les cellules sont ensuite incubées sur un agitateur rotatif en chambre froide à 4°C pendant 30 minutes. Les cellules sont centrifugées à 400g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans 20mL de PBS et filtré sur un filtre 100µm puis centrifugé dans les mêmes conditions. Les culots sont repris dans 300µl de tampon de lyse. Après 3 minutes, la réaction est stoppée en ajoutant 20mL de PBS SVF2%. Les cellules sont filtrées sur un filtre 40µm et centrifugées. Enfin, on enlève le surnageant et on reprend le culot dans 1mL de PBS SVF 2% EDTA 2mM.

Le compte au cytomètre et le marquage membranaire sont effectués dans les mêmes conditions que pour les échantillons sanguins.

3. RESULTATS

3.1. Caractéristiques des patients

La première inclusion a eu lieu le 10/01/18. A la date du 01/10/18, 26 patients ont été inclus dans le groupe « Pneumonie » et 5 dans le groupe « Témoins ». Le **Tableau I** présente les principales caractéristiques cliniques des patients. Concernant la documentation microbiologique des pneumonies, il a été mis en évidence la présence isolée d'une bactérie pour 8 patients (30,8%), d'un virus isolé pour 8 autres patients, d'une bactérie et d'un virus pour 6 patients (23,1%). Chez 4 patients (15,4%), aucune documentation microbiologique n'a pu être obtenue. Les données microbiologiques sont détaillées dans le **Tableau II**. Les données de 11 volontaires sains ont également été analysées.

Tableau I : Caractéristiques cliniques des patients

Paramètres cliniques	Médiane ou pourcentage
Homme, <i>n</i> (%)	14 (53,9%)
Femme, <i>n</i> (%)	12 (46,1%)
Age, années, médiane (Q1 ; Q3)	64 (58 ; 68)
Pathologie respiratoire chronique, <i>n</i> (%)	11 (42.3%)
Immunodépression, <i>n</i> (%)	4 (15.4%)
IGS 2 à l'admission, médiane (Q1 ; Q3)	35.5 (30 à 51)
Ventilation mécanique, <i>n</i> (%)	14 (53.9%)
SDRA, <i>n</i> (%)	13 (50%)
Etat de choc septique, <i>n</i> (%)	2 (7.7%)
Décès en réanimation, <i>n</i> (%)	4 (15.4%)
Sortie vivant de réanimation, <i>n</i> (%)	22 (84.6%)

Tableau II : Documentation microbiologique des pneumonies

Documentation microbiologique	<i>n</i>	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8	30.8%
<i>Myxovirus influenzae A</i>	6	23.1%
<i>Myxovirus influenzae B</i>	4	15.4%
<i>Legionella sp</i>	2	7.7%
<i>Métapneumovirus</i>	2	7.7%
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	3.9%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	3.9%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	3.9%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	3.9%
<i>Virus respiratoire syncytial</i>	1	3.9%

3.2. Analyses des LTNC

3.2.1. Analyse descriptive des taux de LTNC à l'inclusion

Pour identifier les populations d'intérêt (MAIT, LT $\gamma\delta$ et NKT), chaque prélèvement a été traité de façon identique (cf. méthodes), et en utilisant la stratégie de gating présentée en **Figure 1**.

3.2.1.1. Analyse dans le sang

A l'inclusion, nous avons observé une diminution significative de la fréquence des MAIT [0.26 (0.17-0.94) % des CD3+] dans le groupe « Pneumonie » par rapport aux volontaires sains [4.5 (3.3-7.4) % des CD3+] ($p < 0.0001$) (**Figure 2**).

Concernant les LT $\gamma\delta$, leur fréquence n'était pas significativement différente de celle des volontaires sains : [1.8 (0.82-4.7) % des CD3+] versus [3 (2.1-6.3) % des CD3+], respectivement ($p = 0.16$) (**Figure 3**).

Concernant les NKT, leur fréquence était significativement plus basse que celle des volontaires sains : [0.03 (0.01-0.07) % des CD3+] versus [0.09 (0.05-0.26) % des CD3+], respectivement ($p = 0.048$) (**Figure 4**).

3.2.1.2. Analyse dans les aspirations trachéales

Sur les 15 échantillons d'AT testés, seuls 10 présentaient une population lymphocytaire analysable et seuls 2 avaient des LTNC détectables.

Chez un patient, on notait à l'inclusion, 3,90% de MAIT (en pourcentage des lymphocytes CD3+), 1,21% de LT $\gamma\delta$ et 0,06% de NKT. En comparaison, dans le sang au même moment, on retrouvait 1,52% de MAIT, 3,06% de LT $\gamma\delta$ et 0,07% de NKT. Chez le second patient, on notait à l'inclusion, 1,87% de MAIT (en pourcentage des lymphocytes CD3+), 1,71% de LT $\gamma\delta$ et 0,22% de NKT. En comparaison, dans le sang au même moment, on retrouvait 0,91% de MAIT, 1,07% de LT $\gamma\delta$ et 0,15% de NKT.

Ces 2 patients présentaient un SDRA. A J15, alors qu'une amélioration clinique avait été constatée, les LTNC étaient indétectables dans les aspirations trachéales.

3.2.2. Activation et régulation des LTNC

3.2.2.1 Dans le sang

A l'inclusion, dans le groupe « Pneumonie », la proportion de MAIT activés, c'est-à-dire exprimant CD69 était, significativement plus élevée que celles des volontaires sains : [70 (52-

78) % des MAIT], versus [13 (0.63-19) % des MAIT], respectivement ($p=0.0009$) (**Figure 5**, Panel A).

La proportion de MAIT exprimant PD-1 n'était pas significativement différente entre les pneumonies et les volontaires sains : [64 (38-80) % des MAIT] versus [53 (35-71) % des MAIT], respectivement ($p=0.39$) (**Figure 5**, Panel B).

Concernant les $LT\gamma\delta$, dans le groupe « Pneumonie », la proportion de cellules exprimant CD69 était significativement plus élevée que chez les volontaires sains : [24 (17-33) % des $LT\gamma\delta$] versus [7.2 (4.5-13) % des $LT\gamma\delta$], respectivement. Nous ne disposions pas de suffisamment de données sur l'expression de PD-1 chez des volontaires sains pour pouvoir effectuer une comparaison avec les patients.

Enfin, concernant les NKT, la très faible proportion des NKT combinée à un faible nombre total de lymphocytes chez les patients a rendu difficile et non interprétable l'analyse de l'expression de CD69 et PD-1 et n'est donc pas présentée.

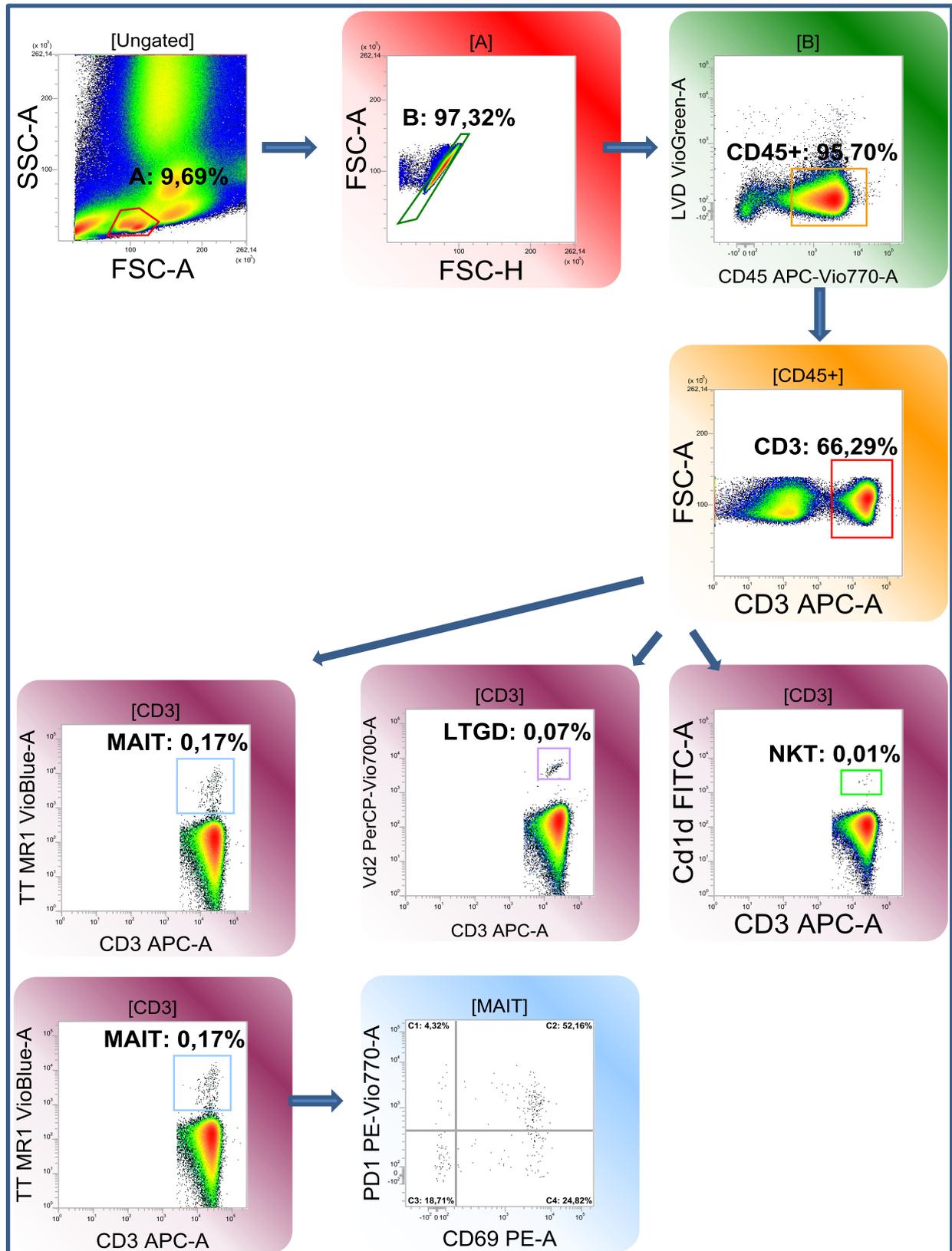


Figure 1 : Stratégie de Gating. La Gate A sélectionne les lymphocytes totaux (9.69%). La Gate B permet d'exclure les agrégats de cellules : on retrouve 97% de singulets. A partir de la Gate B, on sélectionne les cellules CD45+ / Live Dead- correspondant aux leucocytes vivants (95%). A partir de cette population, on sélectionne les cellules CD3+ correspondant aux lymphocytes T (66%). A partir de cette région, on peut estimer les proportions des différentes populations de LTNC. Les comptes des LTNC sont exprimés en pourcentage de cellules CD3+. Les MAIT sont identifiés comme des cellules CD3+ TTMR1+ (0.17%). Les LT $\gamma\delta$ sont identifiés comme CD3+ Vd2+ (0.07%). Les NKT sont identifiés comme CD3+ TTCd1d+ (0.01%). Pour chaque type cellulaire, le pourcentage de cellules CD69+ et PD1+ est calculé. On donne ici en exemple, le pourcentage de MAIT CD69+ et PD1+ (52%).

3.2.2.2. Dans les aspirations trachéales

Chez les deux patients chez qui des LTNC ont été retrouvés, concernant les MAIT, respectivement 87% et 56% présentaient un double marquage CD69 et PD-1. Concernant les LT $\gamma\delta$, respectivement 78% et 42% présentaient un double marquage CD69 et PD-1 (**Figure 6**).

3.2.3. Analyse dynamique des LTNC dans le sang

3.2.3.1. Evolution de la fréquence des LTNC

Concernant les MAIT et les LT $\gamma\delta$, l'analyse longitudinale entre l'inclusion et la sortie (ou J15 si le patient était encore hospitalisé) ne montrait pas de modification significative de fréquence ($p=0.12$ et $p=0.68$ respectivement) (**Figure 7**).

3.2.3.2. Evolution de la proportion des LTNC exprimant CD69 et PD-1

La proportion de MAIT CD69⁺ baissait progressivement chez les patients entre l'inclusion et la sortie ou J15, traduisant une baisse de la fréquence des MAIT activés dans le sang : [69 (55-81) % de MAIT CD69⁺] vs [38 (36-44) % de MAIT CD69⁺], respectivement ($p=0.01$).

La proportion de MAIT PD-1⁺ ne variait pas significativement entre l'inclusion et la sortie ou J15 ($p=0.17$) (**Figure 8**).

Concernant les LT $\gamma\delta$, la proportion de cellules CD69⁺ ne variait pas de façon significative ($p=0.12$). Nous ne disposons pas de suffisamment de données pour évaluer la dynamique de PD-1. Concernant les NKT, nous ne disposons pas de suffisamment de données pour réaliser ces analyses dynamiques.

3.2.4. Analyses fonctionnelles des MAIT dans le sang : production de cytokines après stimulation ex-vivo

Ces analyses ont été réalisées uniquement sur les MAIT. Le choix des MAIT s'est fait en raison des données préliminaires du laboratoire sur un modèle murin de pneumonie grave suggérant une forte implication et modulation des MAIT ; et sur la base de nos résultats préliminaires chez l'homme montrant que les MAIT constituaient la population la plus importante quantitativement et qu'elle subissait les variations les plus importantes au cours de la pneumonie comparée aux autres sous – populations lymphocytaires non conventionnelles. Nous avons évalué la production de 3 cytokines (IL-17, IFN- γ et TNF- α) à l'aide de marquages intra – cellulaires. Un exemple de marquage est donné en **Figure 9**.

Après stimulation, il n'était pas retrouvé de différence significative concernant le pourcentage de MAIT producteurs d'IL-17 et de TNF- α entre le groupe « Pneumonie » et les volontaires sains (**Figure 10**, Panel A et B).

En revanche, la production d'IFN- γ était significativement abaissée dans le groupe « Pneumonie » comparé aux volontaires sains : [40 (28;50) % de MAIT producteurs d'IFN- γ] vs [78 (55;86) % de MAIT producteurs d'IFN- γ], respectivement ($p=0.02$) (**Figure 10**, Panel C).

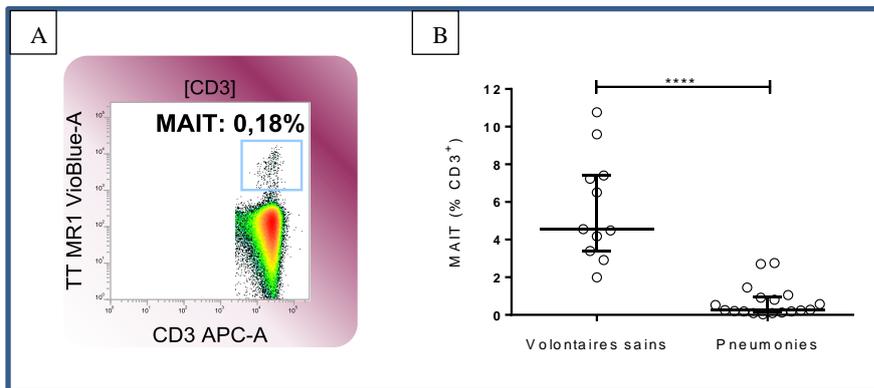


Figure 2 : (A) Dot plot représentatif des MAIT au sein des cellules CD3+ chez un patient. (B) Fréquence des MAIT (en % des cellules CD3+) à l'inclusion chez les patients et les volontaires sains.

**** : $p < 0.0001$.

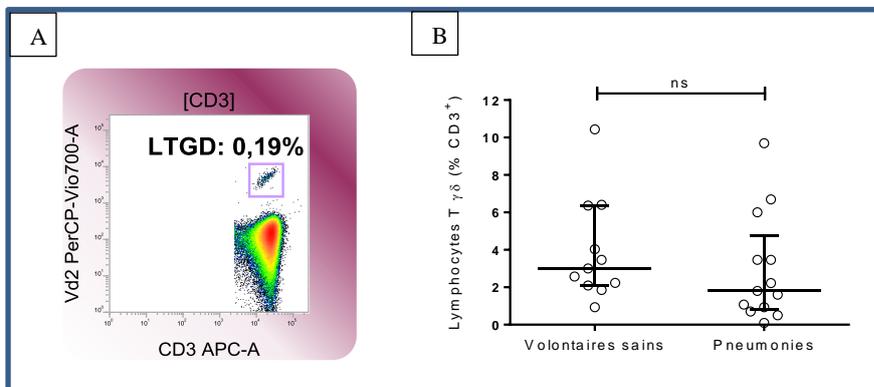


Figure 3 : (A) Dot plot représentatif des LT $\gamma\delta$ au sein des cellules CD3+ chez un patient. (B) Fréquence des LT $\gamma\delta$ (en % des cellules CD3+) à l'inclusion chez les patients et les volontaires sains.

ns : non significatif.

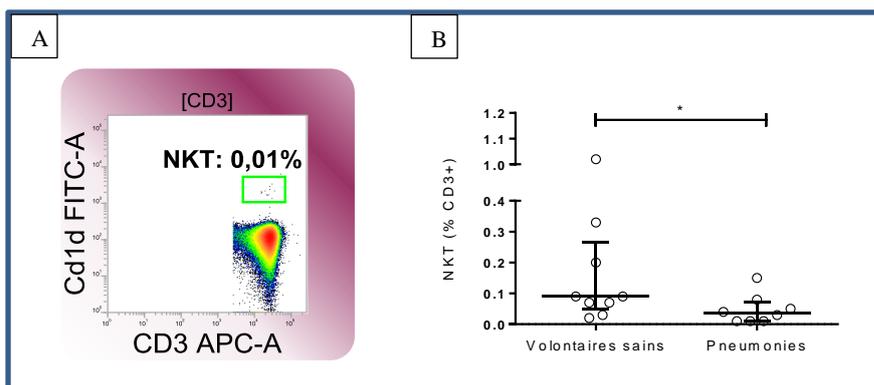


Figure 4 : (A) Dot plot représentatif des NKT au sein des cellules CD3+ chez un patient. (B) Fréquence des NKT (en % des cellules CD3+) à l'inclusion chez les patients et les volontaires sains.

* : $p < 0.05$.

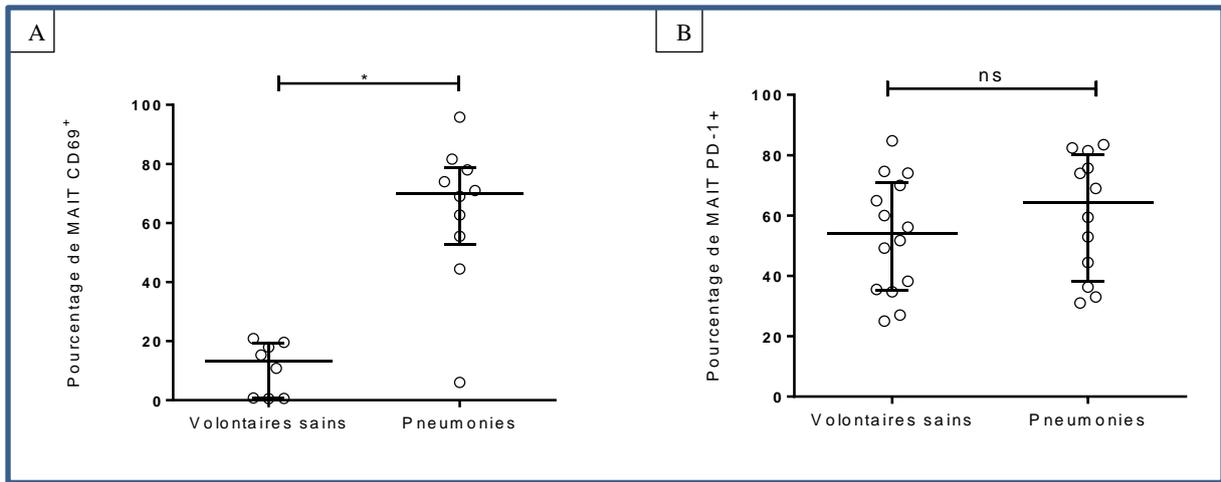


Figure 5 : Proportion de MAIT CD69+ et PD1+ à l'inclusion. * : $p < 0.05$. ns : non significatif.

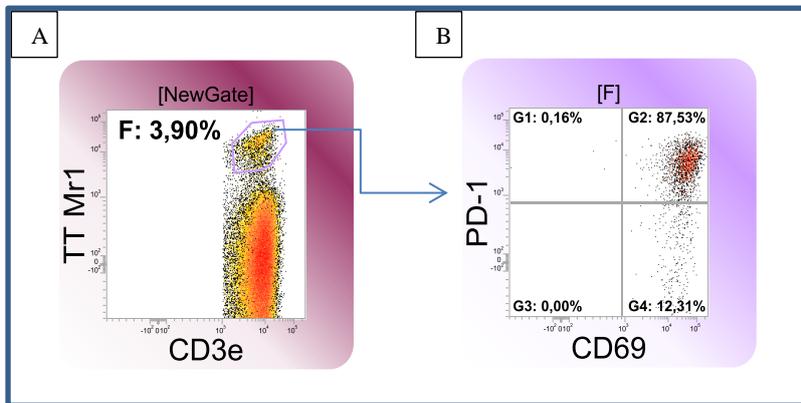


Figure 6 : Proportion de MAIT dans l'aspiration trachéale d'un patient (A) et proportion des MAIT présentant un phénotype CD69⁺ PD1⁺ (B).

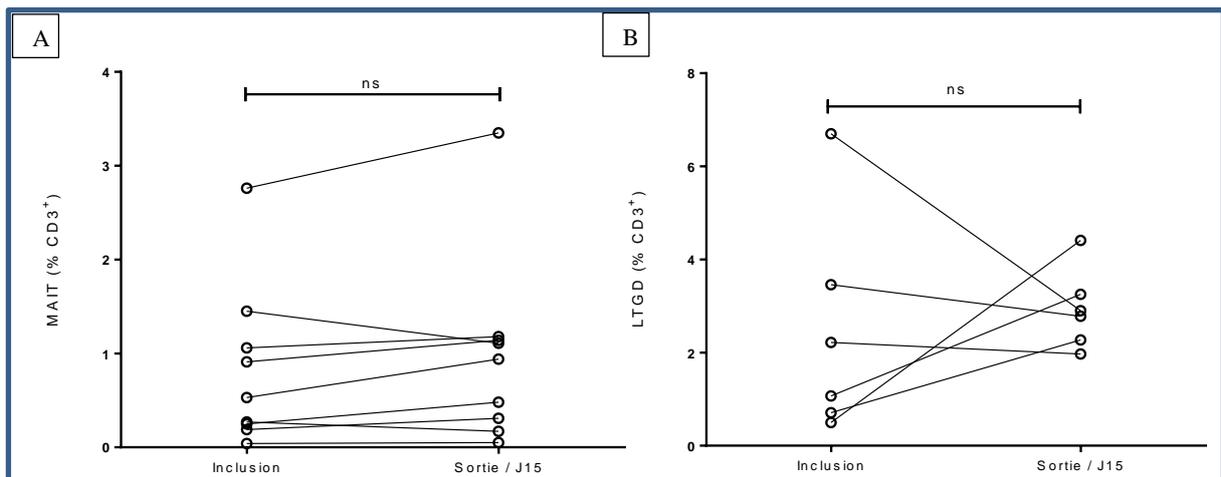


Figure 7 : Evolution des fréquences des MAIT (A) et des LT $\gamma\delta$ (B) dans le sang, chez les patients, entre l'inclusion et la sortie ou J15. ns : non significatif.

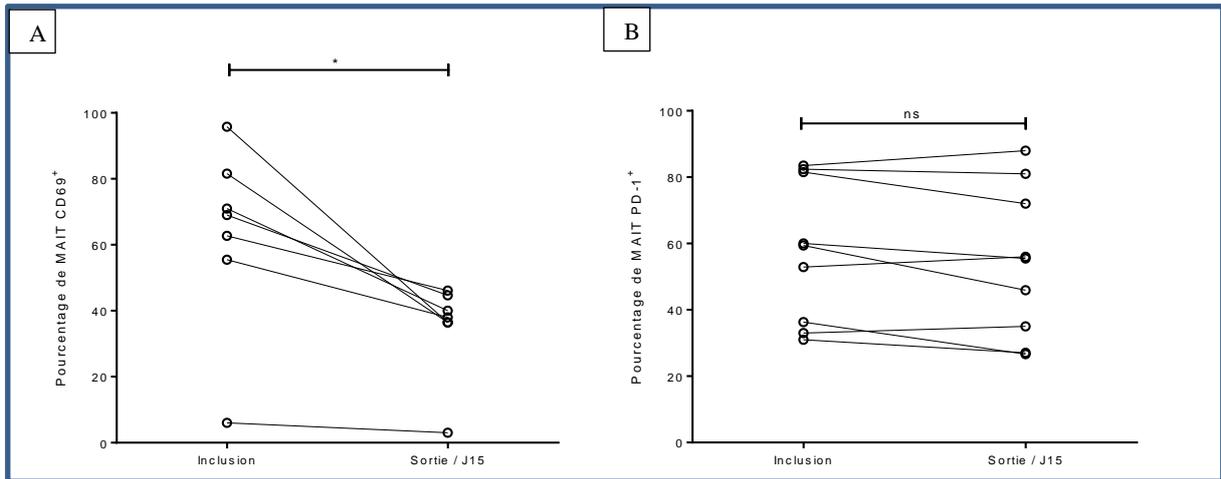


Figure 8 : Evolution des proportions de MAIT exprimant CD69 (A) et PD1 (B) dans le sang, chez les patients, entre l'inclusion et le sortie ou J15. * : $p < 0.05$. ns : non significatif.

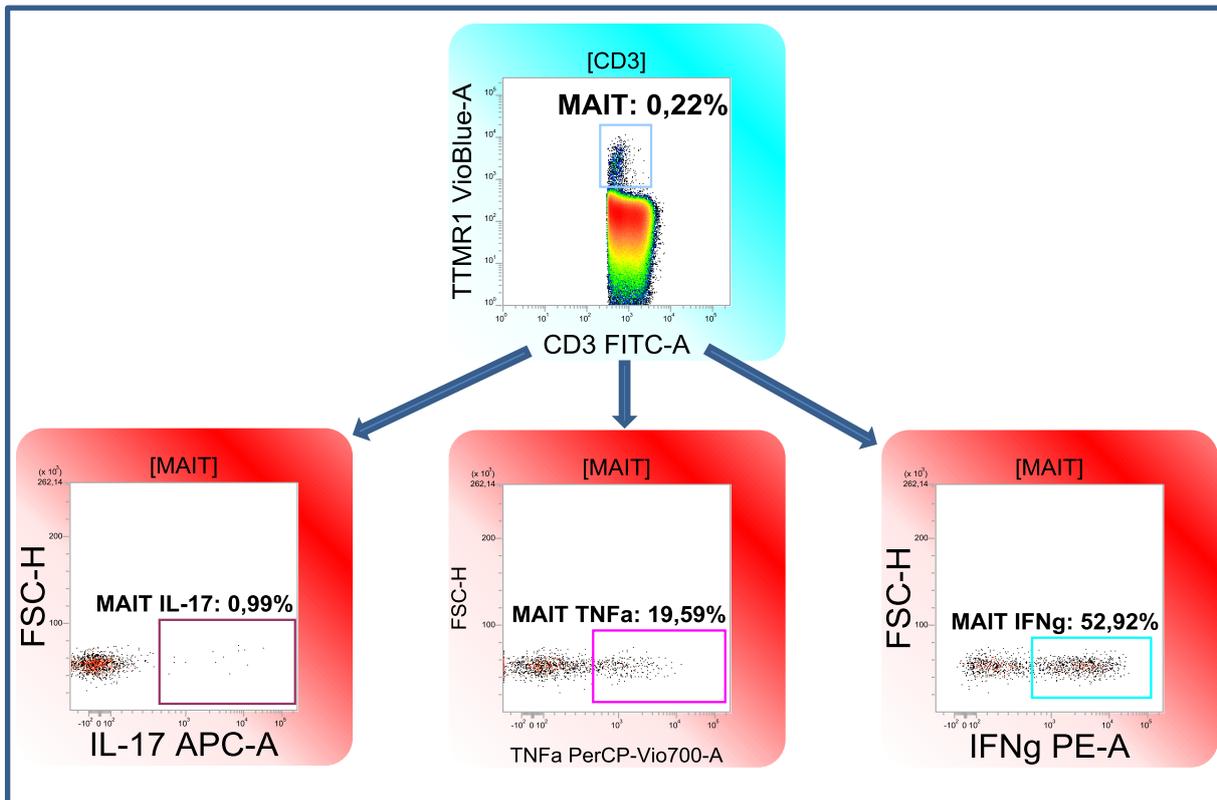


Figure 9 : Dot plot représentatifs des marquages intra-cellulaires pour les cytokines IL-17, TNF- α et IFN- γ réalisés après stimulation ex-vivo par PMA - Ionomycine.

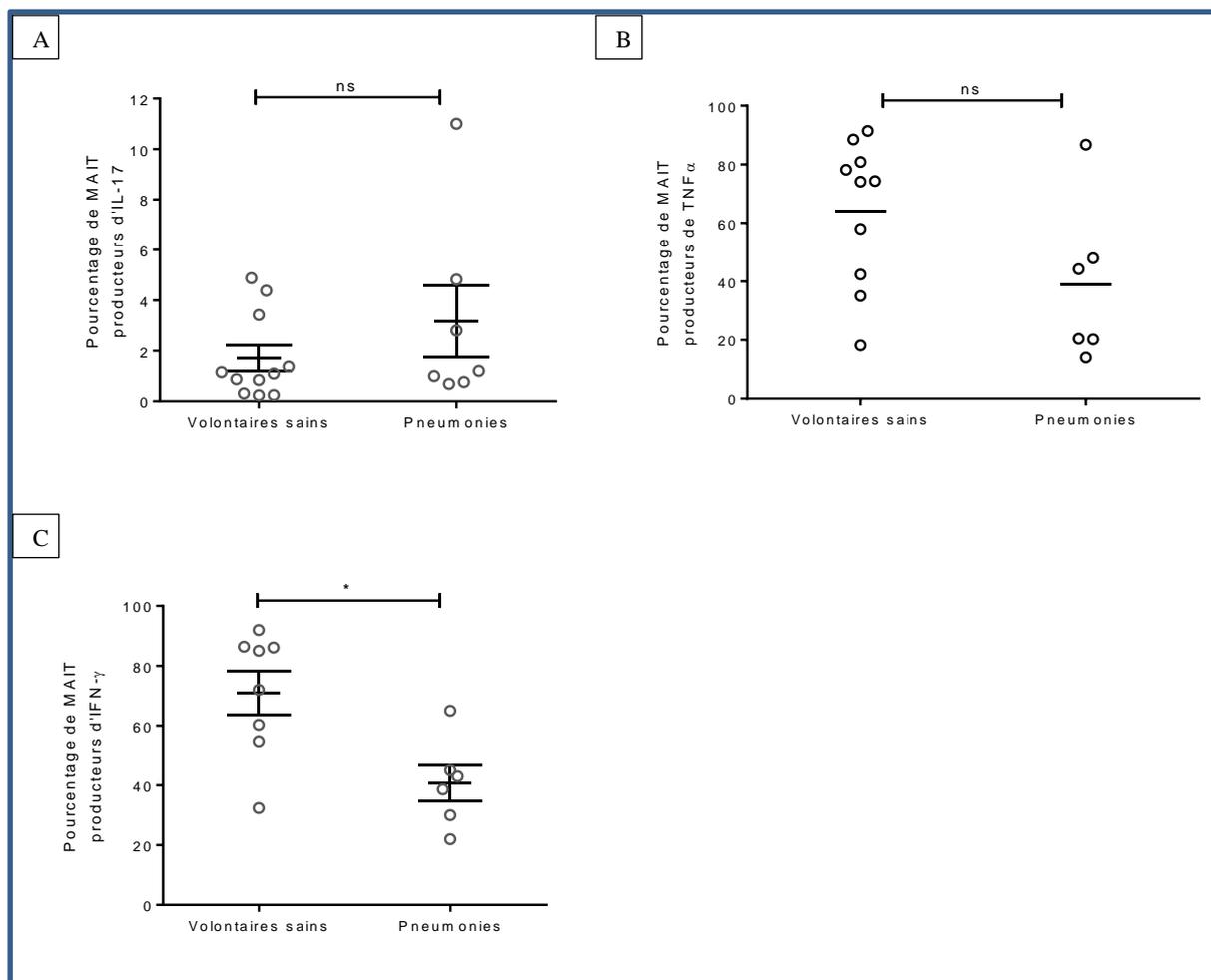


Figure 10 : Pourcentage de MAIT producteurs d'IL-17 (A), de TNF- α (B) et d'IFN- γ (C), après stimulation ex-vivo par PMA – Ionomycine, chez les patients comparés aux volontaires sains. * : $p < 0.05$. ns : non significatif.

4. DISCUSSION

Nous avons réalisé une étude portant sur la fréquence, l'activation et la régulation des LTNC dans les pneumonies graves et le SDRA. Malgré le fort rationnel expérimental sur le rôle de ces populations de découverte récente dans les pneumonies, il existe très peu de données chez l'Homme. Notre travail constitue donc un apport majeur dans la translation de données scientifiques fondamentales pour ré-explore la physiopathologie des problématiques quotidiennes du réanimateur que sont les pneumonies graves et le SDRA.

Nous avons observé une baisse précoce et significative de la fréquence des MAIT chez les patients atteints de pneumonie. Une forte proportion de ces cellules est porteuse du marqueur CD69 dénotant un état d'activation important. La répétition des analyses durant l'hospitalisation en MIR n'a pas montré de variation significative de la fréquence des cellules. En revanche, la proportion de cellules activées diminue avec le temps de façon concomitante à l'amélioration clinique des patients. Il n'y a pas de différence entre les 2 groupes concernant l'expression de PD-1 par les MAIT à l'inclusion et la proportion de MAIT PD-1⁺ ne varie pas significativement au cours de l'hospitalisation en MIR. Au niveau fonctionnel, la proportion de MAIT producteurs d'IFN- γ après stimulation est significativement abaissée dans le groupe « Pneumonie ».

Grimaldi *et al* (45) ont évalué la fréquence des LTNC chez des patients de réanimation admis pour infection sévère (l'origine de l'infection étant une pneumonie communautaire pour 48% d'entre eux) et les ont comparés à des témoins (patients de réanimation non infectés et volontaires sains). En accord avec nos résultats, les patients infectés présentaient une baisse précoce de la fréquence des MAIT comparés aux patients de réanimation non infectés et aux volontaires sains. Dans notre étude, nous avons défini les MAIT grâce à un outil biologique nouvellement disponible (tétramère de MR1 chargé avec un antigène spécifique des MAIT et marqué par un fluorophore) permettant un marquage spécifique de la population MAIT. Or celui-ci n'était pas disponible lors de la réalisation de l'étude de Grimaldi *et al*. Cet outil est désormais considéré comme l'outil de référence, comparé aux anciennes stratégies alternatives de marquage, qui peuvent poser des problèmes de sensibilité et de spécificité (51). Ces résultats font émerger plusieurs questions qui restent non résolues. Quelle est l'origine de la baisse de fréquence observée des MAIT ? S'agit-il d'une augmentation de l'apoptose de ces cellules ? Y a-t-il une « downmodulation » de leur TCR suite à leur activation les rendant virtuellement indétectables ? Enfin, y a-t-il une migration des MAIT vers la muqueuse respiratoire ? Si ces trois hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives, nous pensons que celle concernant la migration vers le site agressé pourrait être la plus prégnante. Ainsi, nous avons retrouvé une proportion importante de MAIT avec un phénotype fortement activé dans les AT de certains patients en phase de SDRA sévère, alors que de façon concomitante, elles étaient retrouvées en proportion moins importante dans le sang. Le Bourhis *et al*. (52) ont pu observer des MAIT dans le tissu pulmonaire de 2 patients porteurs d'une infection à *Mycobacterium tuberculosis*.

Enfin, les travaux en cours du laboratoire portant sur un modèle murin de pneumonie grippale sévère, ont également retrouvé de fortes proportions de MAIT dans les LBA des souris infectées lors de la phase aiguë.

Concernant les $LT\gamma\delta$, notre étude ne retrouvait pas de différence de fréquence entre les pneumonies et les volontaires sains à l'inclusion. Tout comme les MAIT, ces cellules présentaient un phénotype activé. Grimaldi *et al* retrouvaient, quant à eux, une baisse des $LT\gamma\delta$ chez les patients infectés. De même Liao *et al* (46) montraient une diminution de fréquence des $LT\gamma\delta$ chez des patients de réanimation admis pour infection sévère (30% de pneumonies). Il est possible que cette absence de différence soit simplement due à un nombre encore trop faible de patients inclus, puisque nous avons inclus à ce jour seulement 26 pneumonies. Ces résultats seront donc à réévaluer avec l'augmentation du nombre d'inclusions dans l'étude. Cependant, nos différences de résultats avec les 2 travaux précédemment cités peuvent également s'expliquer par des différences méthodologiques. En effet, ces 2 études portaient sur les sepsis/chocs septiques, sans restriction sur l'étiologie. Ainsi, les populations ne sont pas strictement superposables : moins de la moitié des patients des deux études avaient effectivement une pneumonie. L'augmentation du nombre de patients dans notre étude nous permettra peut-être d'identifier si la présence d'un choc septique est, à lui seul, associé à une modification de fréquence et/ou de fonctions de nos populations d'intérêt, par rapport à une pneumonie sans état de choc.

Les NKT baissaient significativement à l'inclusion chez les patients atteints de pneumonie. Grimaldi *et al.* ne retrouvaient pas cette différence. A nouveau, nos différences de résultats peuvent s'expliquer par le faible nombre de patients inclus à ce jour et des critères d'inclusion différents.

Le nombre limité de patients inclus à ce jour ne nous a pas permis de réaliser des corrélations entre la fréquence ou l'état d'activation de nos cellules d'intérêt et l'état clinique (notamment, présence ou non d'un SDRA, score SOFA). L'étude sera poursuivie sur 3 ans afin d'inclure un total de 100 patients dans le groupe « Pneumonies », 50 patients dans le groupe « Témoins ». Ces patients supplémentaires permettront de réaliser ces corrélations.

Outre la fréquence, le niveau d'activation et la production de cytokines, la régulation de la fonction de ces cellules nous semble être un élément fondamental à étudier au regard de notre hypothèse. En effet, compte tenu du rôle d'orchestration de la réponse inflammatoire au sein des muqueuses qu'ont ces cellules, il est logique d'envisager qu'une aberration dans leur régulation pourrait conduire à la persistance de signaux pro-inflammatoires conduisant à des dommages tissulaires importants induits par les cellules effectrices anormalement recrutées. A ce titre, la piste des checkpoints inhibiteurs paraît pertinente, s'agissant de lymphocytes T. Ces voies de régulations des LT, médiées par de nombreux récepteurs -dont le chef de file est PD-1- ont surtout été étudiées dans les LT conventionnels (53). Les découvertes engendrées par ces recherches ont révolutionné la prise en charge de nombreux cancers, puisque l'activation de ces voies est utilisée par certaines cellules tumorales comme stratégie d'immuno-évasion pour « anergiser » les LT, en particulier les LT cytotoxiques, qui tueraient normalement les cellules cancéreuses. Mais, en bloquant pharmacologiquement ces voies inhibitrices des LT, ceux-ci sont réactivés, et deviennent de nouveau efficaces dans la lutte anti-tumorale. Dans le cadre de notre hypothèse, c'est le phénomène inverse que nous suspectons : les LTNC qui ne seraient pas, à un moment de la réponse inflammatoire-suffisamment inhibés pourraient continuer à produire les cytokines pro-inflammatoires entretenant une réponse inflammatoire délétère. Le rôle des checkpoints inhibiteurs a déjà été exploré dans le cadre de maladies infectieuses, mais plutôt dans des situations chroniques (54), et là encore, quasiment exclusivement pour les LT conventionnels. Dans notre travail, nous avons été surpris par le taux très élevé de MAIT exprimant PD-1 chez les volontaires sains. Nous n'avons aucune explication spécifique, si ce n'est que par analogie avec les LT conventionnels, l'expression de PD-1 est probablement en lien avec le fait que ces MAIT ont déjà eu une stimulation de leur TCR. En situation pathologique chronique (hépatite B chronique), il a été rapporté que l'expression de PD-1 sur le MAIT s'associait effectivement à un phénotype « anergisé » (55). Le rôle de PD-1 reste donc à explorer, en premier lieu, dans le cadre du fonctionnement normal des MAIT. Pour cela avons débuté des expériences préliminaires de différentes stimulations des MAIT en analysant spécifiquement les fractions PD-1⁺ et PD-1⁻ des MAIT. Nous souhaitons ensuite les poursuivre chez les prochains patients inclus dans ImPACT.

Ces données, bien que préliminaires, montrent l'implication importante des lymphocytes T non conventionnels et en particulier des MAIT à la phase précoce des pneumonies graves. Ces

cellules sont recrutées, activées et présentent une production cytokinique altérée. Ces données encouragent à poursuivre à la fois l'étude de la compréhension de la biologie de ces cellules et, parallèlement, les modifications qui ont lieu dans les situations hautement pathologiques de pneumonie grave et de SDRA. Si ce champ est encore relativement inexploré dans le cadre d'études translationnelles, d'autres disciplines médicales en sont déjà au stade de l'exploration de perspectives de manipulation de ces cellules à visée « d'immuno-intervention ». Les travaux réalisés à ce jour concernent essentiellement l'immunothérapie anti-cancéreuse (56), avec de nombreux essais cliniques de phase I ou II en cours. Ces cellules semblent donc manipulables et aucun problème de sécurité n'a été détecté à ce jour. Si nous sommes encore loin de perspectives d'immuno-interventions sur les LTNC dans le SDRA, la mortalité dramatique du SDRA d'origine infectieuse pulmonaire et les trois décennies d'échecs d'essais thérapeutiques d'immunomodulation disent la pertinence et l'urgence d'explorer ces nouvelles pistes.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. Quinton LJ, Mizgerd JP. Dynamics of Lung Defense in Pneumonia: Resistance, Resilience, and Remodeling. *Annu Rev Physiol.* 10 févr 2015;77(1):407-30.
2. Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet.* sept 2017;390(10100):1151-210.
3. Prina E, Ranzani OT, Torres A. Community-acquired pneumonia. *The Lancet.* sept 2015;386(9998):1097-108.
4. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N Engl J Med.* 30 juill 2015;373(5):415-27.
5. Walden AP, Clarke GM, McKechnie S, Hutton P, Gordon AC, Rello J, et al. Patients with community acquired pneumonia admitted to European intensive care units: an epidemiological survey of the GenOSept cohort. *Crit Care.* 2014;18(2):R58.
6. Sweeney RM, McAuley DF. Acute respiratory distress syndrome. *The Lancet.* nov 2016;388(10058):2416-30.
7. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primer.* 30 juin 2016;2:16045.
8. Shorr AF, Fisher K, Micek ST, Kollef MH. The Burden of Viruses in Pneumonia Associated With Acute Respiratory Failure. *Chest.* juill 2018;154(1):84-90.
9. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967 Aug 12;2(7511):319-23.
10. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med.* oct 2012;38(10):1573-82.
11. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA.* 23 févr 2016;315(8):788.
12. Herridge MS, Tansey CM, Matté A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A, et al. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 7 avr 2011;364(14):1293-304.
13. Herridge MS, Moss M, Hough CL, Hopkins RO, Rice TW, Bienvenu OJ, et al. Recovery and outcomes after the acute respiratory distress syndrome (ARDS) in patients and their family caregivers. *Intensive Care Med.* mai 2016;42(5):725-38.
14. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. Drazen JM, éditeur. *N Engl J Med.* 10 août 2017;377(6):562-72.

15. Williams AE, Chambers RC. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* févr 2014;306(3):L217-230.
16. McAleer JP, Kolls JK. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunol Rev.* juill 2014;260(1):129-44.
17. Slutsky AS, Ranieri VM. Ventilator-Induced Lung Injury. *N Engl J Med.* 28 nov 2013;369(22):2126-36.
18. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2000;8.
19. Briel M, Meade M, Mercat A, Brower RG, Talmor D, Walter SD, et al. Higher vs Lower Positive End-Expiratory Pressure in Patients With Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.* 3 mars 2010;303(9):865.
20. Laurent P, Jean-Marie F, Arnaud G, Christine P-R, Gilles P, Anderson L, et al. Neuromuscular Blockers in Early Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2010;10.
21. Munshi L, Del Sorbo L, Adhikari NKJ, Hodgson CL, Wunsch H, Meade MO, et al. Prone Position for Acute Respiratory Distress Syndrome. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Am Thorac Soc.* oct 2017;14(Supplement_4):S280-8.
22. Perkins GD, McAuley DF, Thickett DR, Gao F. The β -Agonist Lung Injury Trial (BALTI): A Randomized Placebo-controlled Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med.* févr 2006;173(3):281-7.
23. Smith FG, Perkins GD, Gates S, Young D, McAuley DF, Tunnicliffe W, et al. Effect of intravenous β -2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): a multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet.* janv 2012;379(9812):229-35.
24. McAuley DF, Cross LM, Hamid U, Gardner E, Elborn JS, Cullen KM, et al. Keratinocyte growth factor for the treatment of the acute respiratory distress syndrome (KARE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Respir Med.* juin 2017;5(6):484-91.
25. Kor DJ, Carter RE, Park PK, Festic E, Banner-Goodspeed VM, Hinds R, et al. Effect of Aspirin on Development of ARDS in At-Risk Patients Presenting to the Emergency Department: The LIPS-A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 14 juin 2016;315(22):2406.
26. The National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network. Rosuvastatin for Sepsis-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 5 juin 2014;370(23):2191-200.
27. McAuley DF, Laffey JG, O'Kane CM, Perkins GD, Mullan B, Trinder TJ, et al. Simvastatin in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 30 oct 2014;371(18):1695-703.
28. Peter JV, John P, Graham PL, Moran JL, George IA, Bersten A. Corticosteroids in the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in adults: meta-analysis. *BMJ.* 3 mai 2008;336(7651):1006-9.
29. Meduri GU, Bridges L, Shih M-C, Marik PE, Siemieniuk RAC, Kocak M. Prolonged glucocorticoid treatment is associated with improved ARDS outcomes: analysis of individual patients' data from four randomized trials and trial-level meta-analysis of the updated literature. *Intensive Care Med.* mai 2016;42(5):829-40.

30. ficm_ics_ards_guideline_-_july_2018.pdf [Internet]. [cité 5 sept 2018]. Disponible sur: https://www.ficm.ac.uk/sites/default/files/ficm_ics_ards_guideline_-_july_2018.pdf
31. Fan E, Brodie D, Slutsky AS. Acute Respiratory Distress Syndrome: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*. 20 févr 2018;319(7):698.
32. Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol*. nov 2015;16(11):1114-23.
33. Paskan L, Kasper DL. Building conventions for unconventional lymphocytes. *Immunol Rev*. sept 2017;279(1):52-62.
34. Ivanov S, Paget C, Trottein F. Role of Non-conventional T Lymphocytes in Respiratory Infections: The Case of the Pneumococcus. McFadden G, éditeur. *PLoS Pathog*. 9 oct 2014;10(10):e1004300.
35. Sada-Ovalle I, Sköld M, Tian T, Besra GS, Behar SM. α -Galactosylceramide as a Therapeutic Agent for Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 sept 2010;182(6):841-7.
36. Chua W-J, Truscott SM, Eickhoff CS, Blazevic A, Hoft DF, Hansen TH. Polyclonal Mucosa-Associated Invariant T Cells Have Unique Innate Functions in Bacterial Infection. Flynn JL, éditeur. *Infect Immun*. sept 2012;80(9):3256-67.
37. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, et al. Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. *J Immunol*. 15 avr 2010;184(8):4414-22.
38. Nakamatsu M, Yamamoto N, Hatta M, Nakasone C, Kinjo T, Miyagi K, et al. Role of interferon- γ in $V\alpha 14+$ natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect*. mars 2007;9(3):364-74.
39. Ivanov S, Fontaine J, Paget C, Macho Fernandez E, Van Maele L, Renneson J, et al. Key Role for Respiratory CD103+ Dendritic Cells, IFN- γ , and IL-17 in Protection Against *Streptococcus pneumoniae* Infection in Response to α -Galactosylceramide. *J Infect Dis*. 1 sept 2012;206(5):723-34.
40. Kirby A, Newton D, Carding S, Kaye P. Pulmonary dendritic cells and alveolar macrophages are regulated by $\gamma\delta$ T cells during the resolution of *S. pneumoniae*-induced inflammation. *J Pathol*. mai 2007;212(1):29-37.
41. Kok WL, Denney L, Benam K, Cole S, Clelland C, McMichael AJ, et al. Pivotal Advance: Invariant NKT cells reduce accumulation of inflammatory monocytes in the lungs and decrease immune-pathology during severe influenza A virus infection. *J Leukoc Biol*. mars 2012;91(3):357-68.
42. Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Loo CP, Chapman JM, Meiklejohn DA, Melo FF, et al. Individuals with Pulmonary Tuberculosis Have Lower Levels of Circulating CD1d-Restricted NKT Cells. *J Infect Dis*. mai 2007;195(9):1361-4.
43. Kwon Y-S, Cho Y-N, Kim M-J, Jin H-M, Jung H-J, Kang J-H, et al. Mucosal-associated invariant T cells are numerically and functionally deficient in patients with mycobacterial infection and reflect disease activity. *Tuberculosis*. mai 2015;95(3):267-74.

44. Peng M, Wang Z, Yao C, Jiang L, Jin Q, Wang J, et al. Interleukin 17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Increased in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *Cell Mol Immunol*. juin 2008;5(3):203-8.
45. Grimaldi D, Le Bourhis L, Sauneuf B, Dechartres A, Rousseau C, Ouaz F, et al. Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med*. févr 2014;40(2):192-201.
46. Liao X-L, Feng T, Zhang J-Q, Cao X, Wu Q-H, Xie Z-C, et al. Phenotypic Changes and Impaired Function of Peripheral $\gamma\delta$ T Cells in Patients With Sepsis: SHOCK. *Sept 2017*;48(3):321-8.
47. Loh L, Wang Z, Sant S, Koutsakos M, Jegaskanda S, Corbett AJ, et al. Human mucosal-associated invariant T cells contribute to antiviral influenza immunity via IL-18–dependent activation. *Proc Natl Acad Sci*. 6 sept 2016;113(36):10133-8.
48. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 13 nov 2017;18(3):153-67.
49. Kee S-J, Kwon Y-S, Park Y-W, Cho Y-N, Lee S-J, Kim T-J, et al. Dysfunction of Natural Killer T Cells in Patients with Active Mycobacterium tuberculosis Infection. *Flynn JL, éditeur. Infect Immun*. juin 2012;80:2100-8.
50. Jiang J, Wang X, An H, Yang B, Cao Z, Liu Y, et al. MAIT Cell Function is Modulated by PD-1 Signaling in Patients with Active Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 30 juin 2014;140630082918004.
51. Gherardin NA, Souter MN, Koay H-F, Mangas KM, Seemann T, Stinear TP, et al. Human blood MAIT cell subsets defined using MR1 tetramers. *Immunol Cell Biol*. mai 2018;96(5):507-25.
52. Le Bourhis L, Martin E, Péguillet I, Guihot A, Froux N, Coré M, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol*. août 2010;11(8):701-8.
53. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 13 nov 2017;18(3):153-67.
54. Wykes MN, Lewin SR. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat Rev Immunol*. 9 oct 2017;18(2):91-104.
55. Yong YK, Saeidi A, Tan HY, Rosmawati M, Enström PF, Batran RA, et al. Hyper-Expression of PD-1 Is Associated with the Levels of Exhausted and Dysfunctional Phenotypes of Circulating CD161++TCR α 7.2+ Mucosal-Associated Invariant T Cells in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Front Immunol [Internet]*. 19 mars 2018 [cité 10 oct 2018];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5868455/>
56. Godfrey DI, Le Nours J, Andrews DM, Uldrich AP, Rossjohn J. Unconventional T Cell Targets for Cancer Immunotherapy. *Immunity*. mars 2018;48(3):453-73.

Vu, le Directeur de Thèse
Tours, le

Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le

PEREZ Yonatan

53 pages – 2 tableaux – 10 figures.

RESUME

Introduction - Les pneumonies sévères se compliquent fréquemment de Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe (SDRA). La dérégulation de la réponse inflammatoire est un facteur clé dans la transition de la pneumonie vers un SDRA. Des études pré-cliniques ont montré le rôle primordial des lymphocytes T non conventionnels [Mucosal Associated Invariant T cells (MAIT), Lymphocytes $T\gamma\delta$ ($LT\gamma\delta$), Natural Killer T cells (NKT)] dans les pneumonies et spécifiquement dans le contrôle de la réponse immunitaire pulmonaire. Cependant, les données humaines sont limitées. Nous pensons que l'activation de ces cellules et le contrôle de cette activation doivent être parfaitement régulés pour orchestrer une réponse immunitaire adaptée, et qui n'entraîne pas de dégâts tissulaires majeurs qui aboutiraient à un SDRA. **Méthodes** - Nous avons mené une étude prospective monocentrique portant sur des patients hospitalisés en réanimation pour pneumonie (étude « ImPACT »). A partir de prélèvements sanguins et respiratoires, nous avons analysé, par des techniques de cytométrie en flux : (1) leur fréquence à différents temps durant l'hospitalisation, (2) la présence de marqueurs d'activation/régulation (e.g. CD69 et PD-1), (3) leur capacité de production de cytokines. **Résultats** – 26 patients ont été inclus jusqu'à présent et leurs données ont été comparées à celles de volontaires sains. La moitié des patients présentaient un SDRA et l'IGS II médian était de 35,5 (30-51). Nous avons retrouvé une baisse significative et majeure des MAIT et, dans une moindre mesure, des NKT, dans le sang chez les patients du groupe «Pneumonie» comparé aux volontaires sains. Nous n'avons pas observé de variations significatives de fréquence des $LT\gamma\delta$. Cette diminution importante de la fréquence des MAIT pourrait être liée à un recrutement au site inflammatoire car nous avons pu mettre en évidence une proportion élevée de MAIT dans les aspirations trachéales de certains patients en SDRA. Une forte proportion des MAIT avait par ailleurs un phénotype CD69+ - PD1+. La proportion de MAIT CD69+ diminuait chez les patients ayant une bonne évolution clinique tandis que la proportion de MAIT PD1+ restait stable. Après stimulation ex-vivo, la proportion de MAIT producteurs d'IFN- γ était plus basse chez les patients porteurs de pneumonie que chez les volontaires sains. Aucune différence n'était notée concernant la proportion de MAIT produisant de l'IL-17 et du TNF- α . **Conclusion** - Les MAIT semblent être particulièrement impliquées dans les pneumonies sévères : elles sont recrutées, activées et présentent une sécrétion cytokinique altérée au cours des pneumonies graves. Ces données préliminaires justifient la poursuite d'une analyse approfondie des fonctions des MAIT chez les patients porteurs de pneumonie, en corrélation avec l'état clinique.

Mots clés : pneumonie, syndrome de détresse respiratoire aigüe, lymphocytes T non conventionnels, immunité innée

JURY

Président : Monsieur le Professeur Pierre-François DEQUIN, Médecine Intensive Réanimation, CHU de Tours ; Faculté de Médecine de Tours

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Youenn JOUAN, Médecine Intensive Réanimation, CHU de Tours

Membres :

Monsieur le Professeur Dominique PERROTIN, Médecine Intensive Réanimation, CHU de Tours ; Faculté de Médecine de Tours

Monsieur le Professeur Stéphane EHRMANN, Médecine Intensive Réanimation, CHU de Tours ; Faculté de Médecine de Tours

Monsieur le Docteur Christophe PAGET, Chargé de recherche INSERM – UMR INSERM 1100

Monsieur le Docteur Mustapha SI-TAHAR, Directeur de recherche INSERM – UMR INSERM 1100

Monsieur le Docteur Bertrand LIOGER, Médecine Interne, PH, CHU Saint-Louis – Paris

Date de soutenance : 19 octobre 2018