UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THÈSE

Pour obtenir le grade de :
Docteur de l'Université d'Aix-Marseille
Discipline : Bioinformatique et Génomique

Au-delà des études d'association à l'échelle du génome :

Étude transcriptomique et identification des variants régulateurs impliqués dans le développement du sepsis

Par Florian ROSIER

Le 20 décembre 2019

Devant le Jury composé de :

Docteur Catherine NGUYEN Président du Jury

Docteur Emmanuelle GENIN Rapporteur

Docteur François SABOT Rapporteur

Docteur Julien TEXTORIS Examinateur

Docteur Lydie PRADEL Co-Directeur de thèse

Professeur Pascal RIHET Co-Directeur de thèse

« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte. »

Louis Pasteur

Résumé

En 2017, l'Assemblée mondiale de la Santé et l'Organisation mondiale de la Santé ont fait du sepsis une priorité de santé mondiale en adoptant une résolution pour améliorer, prévenir, diagnostiquer et gérer le sepsis. Cette pathologie tue une personne dans le monde toutes les 3,5 secondes principalement des personnes déjà fragilisées comme les nouveau-nés ou les personnes âgées mais aussi les patients ayant subis des interventions médicales. Il a été démontré que l'état du patient et la réponse immunitaire de l'hôte est primordiale dans le développement de la pathologie. Une meilleure compréhension des bases moléculaires et cellulaires de la maladie est nécessaire. Bien que souvent remis en cause, l'utilisation du modèle murin permet de mimer la physiopathologie du sepsis humain.

Mon projet de thèse a consisté à étudier la réponse transcriptionnelle des cellules péritonéales. Pour cela une inflammation stérile a été provoquée par injection de LPS, issus de *Pseudomonas aeruginosa*, dans le péritoine de la souris. La réponse des cellules péritonéales de ces souris a été étudiée au cours du pic inflammatoire et juste avant la mort, puis ces résultats ont été comparés aux données moléculaires issues de patients atteints du sepsis. Les résultats nous ont permis de montrer que le modèle souris reflète en partie les observations faites chez les patients. Ceci permet d'envisager des études dans ce modèle pour documenter des relations de cause à effet et de tester notamment le rôle de certains gènes dans la physiopathologie.

De plus, j'ai recherché des polymorphismes qui pourraient à la fois altérer le niveau d'expression de gènes et modifier la survie de patients atteints de sepsis. Depuis l'avènement des études d'association à l'échelle du génome, un nombre important de polymorphismes (SNP) ont été identifiés comme étant associés à un phénotype ou à une pathologie. Chacun de ces SNPs est un "tag SNP" car des centaines de variants en déséquilibre de liaison génétique sont hérités en même temps. Pour établir la causalité d'un variant génétique associé à la maladie, il faut démontrer clairement son effet à l'échelle moléculaire et prouver un lien avec la maladie.

Par une approche GWAS, nous avons identifié au laboratoire 139 SNPs associés à la mortalité précoce (avant 7 jours) ou tardive (entre 7 et 28 jours) dans une cohorte de 832 patients atteints de sepsis. J'ai identifié 1450 SNPs en fort déséquilibre de liaison avec les SNPs associés, dont 1439 se situent dans des régions non codantes proches de gènes. Dans le but d'identifier les SNPs causaux pouvant avoir un rôle régulateur et de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'association de ces polymorphismes, j'ai caractérisé les effets cis-régulateurs de ces SNPs par des approches bio-informatiques et des approches fonctionnelles expérimentales.

J'ai identifié ceux qui se situent dans des régions régulatrices comme les enhancers, les silencers ou les promoteurs et qui pourraient ainsi moduler l'expression des

gènes. J’ai ainsi priorisé les SNPs et sélectionné le meilleur SNP candidat pour une validation expérimentale. J’ai utilisé la technique de Crispr-Cas9 et la technique du gène rapporteur pour tester d’une part la fonction de la région contenant le SNP et d’autre part l’effet du SNP lui-même. Les résultats montrent que la région contenant rs143356980 a une activité enhancer sur le gène CISH dans des cellules stimulées ou non par le IFN-gamma ou le LPS. Ils montrent aussi que rs143356980 modifie cette activité dans des cellules stimulées ou non par le IFN-gamma.

Ces 2 projets mettent en évidence des mécanismes de régulation de gènes clés potentiellement impliqués dans la survie des patients atteints de sepsis.

Abstract

In 2017, the World Health Assembly and the World Health Organization made sepsis a global health priority by adopting a resolution to improve, prevent, diagnose and manage sepsis. This disease kills a person in the world every 3.5 seconds, mainly people who are already weak, such as newborns or the elderly, but also patients who have undergone medical interventions. It has been shown that the patient's condition and the host's immune response are essential in the development of the disease. A better understanding of the molecular and cellular basis of the disease is needed. Although often questioned, the use of the mouse model makes it possible to mimic the pathophysiology of human sepsis.

My thesis project consisted in studying the transcriptional response of peritoneal cells. For this purpose, sterile inflammation was caused by injection of LPS, derived from *Pseudomonas aeruginosa*, into the peritoneum of the mouse. The peritoneal cell response of these mice was studied during the inflammatory peak and just before death, and these results were compared with molecular data from patients with sepsis. The results allowed us to show that the mouse model partly reflects the observations made in patients. This makes it possible to consider studies in this model to document cause-and-effect relationships and in particular to test the role of certain genes in physiopathology.

In addition, I looked for polymorphisms that could both alter the level of gene expression and change the survival of patients with sepsis. Since the advent of genome-wide association studies, a significant number of polymorphisms (SNPs) have been identified as being associated with a phenotype or pathology. Each of these SNPs is a "SNP tag" because hundreds of variants in genetic linkage disequilibrium are inherited at the same time. To establish the causality of a genetic variant associated with the disease, its effect must be clearly demonstrated at the molecular level and a link to the disease must be demonstrated.

Using a GWAS approach, we identified 139 SNPs associated with early (before 7 days) or late (between 7 and 28 days) mortality in a cohort of 832 sepsis patients in the laboratory. I have identified 1450 SNPs with a strong linkage imbalance with associated SNPs, of which 1439 are located in non-coding regions close to genes. In order to identify causal SNPs that may have a regulatory role and to understand the molecular mechanisms underlying the association of these polymorphisms, I have characterized the cis-regulatory effects of these SNPs through bioinformatics and experimental functional approaches.

I have identified those that are located in regulatory regions such as enhancers, silencers or promoters and could thus modulate gene expression. I prioritized the SNPs and selected the best candidate SNP for experimental validation. I used the Crispr-Cas9 technique and the reporter assay technique to test the function of the region containing the SNP on the one hand and the effect of the SNP itself on the

other. The results show that the region containing rs143356980 has enhancer activity on the CISH gene in cells stimulated or not by gamma-IFN or LPS. They also show that rs143356980 modifies this activity in cells stimulated or not by gamma-IFN.

These 2 projects highlight regulatory mechanisms of key genes potentially involved in the survival of patients with sepsis.

Remerciements

Mes remerciements vont au Docteur Génin et au Docteur Sabot pour avoir accepté d'évaluer ces travaux, ainsi qu'au Docteur Textoris et au Docteur Catherine Nguyen pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Docteur Catherine Nguyen pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour sa bonne humeur et son soutien dans les événements que nous avons organisé dans le laboratoire.

Je tiens tout particulièrement à remercier Pascal Rihet ainsi que Lydie Pradel mes 2 encadrants qui ont choisi de me faire confiance depuis mon stage de M2 jusqu'à cette fin de la thèse. Vous m'avez soutenu, encadré et suivi dans mes théories plus ou moins bizarre.

J'aimerais remercier aussi l'ensemble de l'équipe pédagogique, que ce soit les enseignants qui m'ont fait confiance, pour m'avoir appris le métier et m'avoir laissé faire les choses à ma manière, vous m'avez donné envie de faire ce métier.

Je voudrais remercier tous mes amis ceux qui sont ou ont été au labo et qui me supportent tous les jours, certains d'entre eux sont devenu des amis à l'extérieur du labo Jeanne, Laurent et Quentin. Heureusement qu'il y a ces parties de cartes entre midi et 1h, des soirées films/séries, jeux de rôles ou jeux de société. Ceux qui ont partagé mon bureau Lydie, Alex, Michel et Guillaume et qui m'auront fait rire entre 2 moments sérieux. Mes amis d'Hippothèse avec qui je passe de super soirée et qui me font venir au réunion alors même que je ne suis plus membre. Enfin ceux qui sont mes amis depuis des années Lilian, Sylvain, Elodie, Lucie, Marie, Fab et Sabrina.

Tous les membres du TAGC qui soit parti, ou vienne d'arriver on ne peut pas trouver de labo plus conviviale et accueillant et cela grâce à ces membres.

Enfin je tiens à remercier mes tous premiers et plus fervents supporteurs, ma famille. Pour leur confiance sans faille quels que soient mes choix leur présence à mes côtés, même s'ils ne comprennent pas tous ce que je raconte, sans laquelle je n'aurais jamais traversé toutes ses épreuves.

Table des matières

Résumé *4*

Abstract *7*

Remerciements *10*

Liste des figures : 14
Liste des tableaux : 15
Liste des abréviations : 16

Introduction *20*

LE SEPSIS 21

A) Historique 21
B) Manifestation clinique 27
C) Epidémiologie 31

LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE L'HÔTE 33

A) Hyperinflammation 35
B) Résolution immunitaire 36
C) Suppression immunitaire 39
D) Modifications moléculaires dans le sepsis 41
E) Défauts cellulaires 44
F) Thérapies immunomodulatrices en cas de sepsis 56

GÉNÉTIQUE HUMAINE 64

A) De l'étude d'association à l'annotation de SNP dans les régions non codantes 64
B) Approches génétique et transcriptomique de la susceptibilité au sepsis 78

Objectif et justification du projet *85*

Résultats *88*

Résultat 1 89

Résultat 2 113

Discussion et perspective *158*

Analyse transcriptomique de la réponse des cellules péritonéales de souris et comparaison avec la réponse septique humaine 159

Analyse de SNPs régulateurs dans le non codant 161

Effet combinatoire de SNP dans le phénotype (épistasie) 163
Classement des SNPs non codants à l'aide d'outil utilisant le *machine learning* 164
Etude de l'effet expérimental des SNPs régulateurs à haut débit 166

Des variants génétiques régulateurs, des gènes différentiellement exprimés, et des modèles biologiques du sepsis 168

Conclusion *170*

Bibliographie *173*

Liste des figures :

Figure 1 : Les maladies infectieuses les plus pertinentes, telles que rapportées par l'étude Global Burden of Diseases

Figure 2 : Nouvelle définition du sepsis défini lors de la troisième définition consensuelle internationale pour le sepsis et le choc septique (Sepsis-3)

Figure 3 : Répartition actuelle de la mortalité due à la septicémie.

Figure 4 : L'équilibre des réponses inflammatoires versus anti-inflammatoires dans le développement du sepsis

Figure 5 : Conception classique des réponses pro et anti-inflammatoires lors du sepsis

Figure 6 : Effet Warburg lors de la stimulation des monocytes

Figure 7 : Répartition des SNPs associés dans des analyses

Figure 8 : Différence entre un SNP associé et un SNP causal

Figure 9 : Principales analyses in silico pour l'annotation des variants dans les régions non-codantes

Figure 10 : Modèle de la réponse inflammatoire des cellules péritonéales chez les souris injectées avec du LPS

Figure 11 : Modèle de régulation du rs143356980 A) rs14335690-C B) rs143356980-T

Figure 12 : Plot des –Log10(p-valeur) des outils Tagoos et IW-scoring

Figure 13 : Protocole résumé pour les expériences de MPRA

Figure 14 : Comparaison entre la séquence délétée par crispr-cas9 dans notre étude et le génome de mus musculus

Figure 15 : Stratégie pour tester l’effet du rs143356980 dans in modèle in vivo

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Calcul du score SOFA

Tableau 2 : Calcul du score qSOFA

Tableau 3: SNPs associés au sepsis et leurs gènes associés

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ang-2 : angiopoïétine-2

APC : cellules présentatrice de l'antigène

ARN: acide ribonucléique

ARNe: ARNenhancer

ARNg: ARN guide

ATP: adénosine triphosphate

BM: Moelle osseuse

Cas 9 : CRISPR associated protein 9

CCL : Chemokine ligands

CD : Cellule Denditrique

CD avec nombre: cluster de différenciation

CDc : CD conventionnels

CDp : CD plasmacytoïdes

CE : cellules endothéliales

Cellule γδ T : Cellules lymphocytes gamma delta T

Chip: Chromato-immuno précipitation

CISH: Cytokine-inducible SH2-containing

CLP : progéniteurs lymphoïdes communs

CMH : Complexe majeur d’histocompatibilité

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

COX : Cytochrome C Oxidase

CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CXC : chemokine

CXCL : chemokine (C-X-C motif) ligand

DAMP : Damage Associated Molecular Patterns

DHA : Acide DocosaHexaénoïque

DHS : hypersensibles à la DNase

DOCK : dedicator of cytokinesis

DSB : coupure double brin de l'ADN

EPA : Acide EicosaPentaénoïque

EPO : Érythropoïétine

eQTL : expression les loci de caractères quantitatifs

FLT3L: FMS-like tyrosine kinase 3 ligand

Glut1 : transporteur de glucose 1

GM-CSF : granulocytes-macrophage-CSF

GWAS : Etude d'association à l'échelle pangénomique

H3K27ac : acétylation de lysine 27 sur l'histone 3

H3K4me1 : histone 3 marquée par la monométhylation de la lysine 4

H3K4me3 : histone 3 marquée par la triméthylation de la lysine 4

HAT : Histones AcétylTransférases

HDR : réparation homologue

HIF-1a: hypoxie – 1a

HLA: human leukocyte antigen

IFN : Interféron

IL : Interleukine

iNOS : oxyde nitrique synthase inductible

IRA : lymphocytes B activateurs de la réponse innée

LD : déséquilibre de liaison

LPS : Lipopolysaccharide

MAC : complexe d'attaque membranaire

MCP : Macrophage chemotactic protein

MDSC : Cellules suppressives myéloïdes

MPO : myéloperoxydase

MPRA : Massively Parallel Reporter Assays

mTOR : cible mécanique de la rapamycine

NE: élastase neutrophile

NFKB: nuclear factor-kappa B:

NHEJ : réparation non homologue

NK : Natural Killer

NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns

PARP: Poly(ADP-Ribose) Polymérase

PCT: Polymerase chain reaction

PD-1: Programmed cell death 1

PEN : Pièges Extracellulaires des Neutrophiles

PPR: Pattern Recognition Receptor

PR3 : protéinase 3

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

qPCR : quantitative Polymerase chain reaction

RCT : récepteur de lymphocytes T

RNS : espèces azotées réactives

ROS : réactives de l'oxygène

RvT: Resolvin

SCI : syndrome du catabolisme

SDRA : syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SOCS: Suppressor of cytokine signaling

SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment

SRIS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique

STARR: self-transcribing active regulatory region sequencing

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

TAD : domaines d'association topologique

TALEN : nucléases effectrices de type activateur de transcription

Teff : lymphocytes T effecteurs

TF : Facteur de transcription

TGF: Transforming growth factor

Th: Lymphocyte T helper

TLR: Toll-like receptor

TLR: Toll-Like Receptor

TNF : Tumor necrosis factor

Tregs : Lymphocytes T régulateurs

TSS : Transcription Start Site

USI : unité de soin intensif

ZFP : protéines à doigts de zinc

Introduction

LE SEPSIS

Le mot sepsis est le terme anglo-saxon et international employé pour caractériser une réponse inflammatoire généralisée associée à une infection. Le terme sepsis, a été créé en 1837 par le médecin français Pierre Piorry, à partir des mots grecs Σήψις (putréfaction) et αίμα (sang) et désigne la présence de bactéries (voire de champignons ou de virus) dans le sang. Le sepsis affecte principalement les individus déjà fragilisés comme les nouveau-nés ou les personnes âgées.

A) Historique

- **Le sepsis et les anciens grecs et romains**

Les maladies infectieuses sont l'une des principales causes de décès chez l'homme depuis les premières tablettes découvertes. Par exemple, les données disponibles suggèrent qu'un tiers à la moitié de la population totale de l'Europe et de l'Asie ont été anéantis lors de la peste noire du début du XVe siècle. Les preuves de la présence de sepsis chez l'homme s'étendent jusqu'à l'antiquité

La première utilisation du mot " sepsis " dans le contexte médical remonte à plus de 2700 ans dans les poèmes d'Homère. Dans cet usage, le terme " sepsis " dérive directement du mot " sepo " (shpu), qui signifie " je pourris ". Le terme se retrouve également dans les écrits du grand physicien et philosophe Hippocrate (vers 400 av. J.-C.) dans son Corpus Hippocraticum. Hippocrate est bien connu pour l'introduction du concept d'humeur corporel dysrégulé (les fluides corporels du sang, de la bile jaune, de la bile noire et du flegme) comme cause de maladie. Hippocrate considérait le sepsis comme la maladie dangereuse, odieuse et biologique qui pourrait se produire dans le corps. On croyait en outre que cette décomposition biologique se produisait dans le côlon et libérait des " principes dangereux " qui pouvaient causer l'"auto-intoxication ". Hippocrates a été l'un des premiers à examiner les propriétés antiseptiques de composés médicinaux potentiels, y compris l'alcool dans le vin et le vinaigre. Galen (129-199 ap. J.C) était un éminent médecin et philosophe romain d'origine grecque. Galen a également été une figure historique dans l'étude des théories du sepsis. Grâce à son sens aigu de l'observation, il était considéré comme une autorité en médecine. Ses premiers écrits et théories sur la médecine sont restés largement inexplorés jusqu'à environ 1500 ans plus tard. La pratique de Galen a été consacrée à la circulation sanguine et le drainage des abcès, mais c'était l'utilisation des médicaments pour traiter la maladie qui a été sa passion. Sa collection de médicaments (" apotheca ") a été le précurseur de l'apothicairerie (pharmacie) actuelle. L'une de ses créations médicinales les plus populaires était la thériaque, un mélange de plus de 70 substances. Ce mélange était utilisé pour tout, y compris le traitement des morsures venimeuses, l'inflammation et pour repousser la peste noire. La popularité de la thériaque tient

sans doute à l'un de ses principaux ingrédients : l'opium, dont Galen a été le premier à décrire des blessures guéries. Il a aussi théorisé que la formation de pus (il l'a décrit comme "pus louable") était critique pour la guérison des tissus blessés. Cette théorie est restée incontestée jusqu'à ce que Léonardo-DaVinci et Andreas Vesalius, au XVe siècle, remettent en question les bienfaits présumés de la suppuration des plaies s'appuyant sur les théories de la putréfaction des Grecs, les premiers Romains étaient convaincus que dans les marais, le sepsis résultait de la production de créatures invisibles qui émettaient des gaz de putride appelés "miasma" ou "miasmata". La théorie selon laquelle ces organismes nuisibles générés spontanément était à la base des initiatives des Romains en matière de santé publique. Pour les Romains, la santé et l'hygiène étaient primordiales, c'est pourquoi les premières initiatives sanitaires visaient à éliminer ces marécages et à créer des systèmes d'approvisionnement en eau salubre et élaborés ainsi que des bains communautaires. Malheureusement, les premiers médecins romains n'ont pas développé la théorie de la transmission des maladies infectieuses par contact et les mesures préventives pour réduire la transmission n'ont jamais été mises en œuvre.

- **Les premiers travaux sur la transmission des maladies infectieuses et la découverte d'animacules**

'Marcus Terentius Varro, in "De re rustica libri III", fut le premier à formuler la notion de contagion. *"De petites créatures invisibles à l'œil, remplissent l'atmosphère et respirent par le nez, causant des maladies dangereuses"*. Au cours des millénaires qui ont suivi son analyse perspicace, des pandémies majeures de peste bubonique et pneumonique, de choléra, de variole, de rougeole, de tuberculose, de syphilis, de gonorrhée et de grippe ont dévasté la population humaine. Dans De contagione et contagiosis morbis (1546), Hieronymus Fracastorius a écrit de "contagium virum", la première suggestion claire de ce que l'on appelle désormais la "théorie des germes". Dans son traité, trois formes de contagion étaient décrites. Il a émis l'hypothèse que la transmission des infections se faisait soit par contact direct, soit indirectement par le biais d'articles infectés (foments), soit par transmission à distance (par voie aérienne). Il a en outre proposé que la transmission de l'infection était due à des corps minuscules qui avaient le pouvoir de se reproduire et de se multiplier. Ce n'est qu'en 1684 que la théorie de la génération spontanée de l'infection a commencé à être réfutée. Francisco Redi (1626-1697) a mené des expériences sur la putréfaction de la viande. Dans une expérience, il a placé de la viande dans des pots et l'a recouverte avec de la gaze en maille ou un joint étanche à l'air. Il a découvert que lorsque la viande était laissée à l'air libre, des mouches avaient atterri sur la viande et qu'elle a rapidement été recouverte d'asticots. Dans la viande qui se trouvait dans le pot recouvert de gaze, les asticots n'étaient présents que sur la gaze mais pas sur la viande elle-même. La viande qui se trouvait dans la marmite recouverte d'un matériau hermétique ne contenait aucune larve. Cette expérience a mis au défi le

dogme de la génération spontanée, soutenue par Galen. Ironiquement, le développement contemporain du microscope a été utilisé pour réfuter les résultats expérimentaux de Redi. Le microscope a permis de visualiser des " petits animaux " et a été utilisé comme preuve que la putréfaction pouvait générer spontanément ces organismes. Galilée a été le premier à développer un microscope qui était essentiellement une modification de son télescope. Cependant, à cause de problèmes techniques, les images créées par son microscope étaient floues et avaient une mauvaise résolution. Ce n'est que plusieurs centaines d'années plus tard que la résolution du microscope s'est améliorée et a permis aux scientifiques d'étudier la vie au niveau cellulaire. Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723) n'avait aucune formation scientifique ou médicale, mais il a pu construire son propre microscope et faire un certain nombre de découvertes importantes pour faire avancer l'étude des maladies infectieuses. La première description et les dessins d'" animacules " de Leeuwenhoek en 1674, incluant les sphères, tiges et spirales (c'est-à-dire cocci, bacille et spirochetes), ont permis aux autres scientifiques de développer davantage la théorie germinale.

- **L'âge d'or de la théorie des germes : Semmelweiss, Lister, Koch et Pasteur**

Le XIXe siècle a marqué le début d'une ère de croissance exponentielle des connaissances sur l'origine et la transmission des maladies infectieuses. Joseph Lister, Ignaz Semmelweiss, Louis Pasteur et Robert Koch étaient tous des médecins au XIXe siècle qui ont contribué à faire avancer l'origine du sepsis. Le premier de ces personnes, Ignaz Semmelweiss (1818-1865) était médecin à Vienne, en Autriche. En 1841, il travaille dans une maternité et constate un taux élevé de décès dus à la fièvre du lit d'enfant, appelée aussi sepsis puerpérale. Semmelweiss a également observé que les femmes dont les accouchements étaient assistés par des sages-femmes avaient un taux d'infection significativement plus faible que celles qui étaient assistées par des étudiants en médecine (2% contre 16%). À l'époque, les étudiants en médecine pratiquaient des autopsies sur les femmes décédées la veille, puis, sans se laver les mains, procédaient à des accouchements plus tard dans la journée. Ce n'est que lorsqu'un de ses collègues est décédé d'une infection (contractée après s'être coupé accidentellement lors d'une autopsie) que Semmelweiss a fait le lien entre les accouchements des étudiants en médecine, les autopsies et le sepsis puerpérale. Semmelweiss a commenté : " Les doigts et les mains des étudiants et des médecins, souillés par de récentes dissections, transportent les poisons de ces cadavres mortels dans les organes génitaux des femmes en couches. Semmelweiss a alors institué une politique de lavage des mains dans sa maternité avant le contact du patient et il a vu les taux de sepsis puérinier baisser à moins de 3%. Malgré ces résultats impressionnants, le concept du lavage des mains n'a pas été accueilli avec enthousiasme par l'établissement médical de l'époque. Il a été renvoyé de son poste à l'hôpital et est mort plus tard

dans un asile de fous d'une infection qu'il avait contractée après s'être lacéré un doigt. Ironiquement, l'infection était probablement due à Staphylococcus ou Streptococcus, et ressemblait donc de façon frappante à un sepsis puerpéral.

Le milieu du XIXe siècle a également vu la croissance exponentielle des interventions chirurgicales. La mise au point d'anesthésiques a réduit la peur et la douleur associées à la chirurgie, mais l'incidence d'infection et de décès consécutifs à une sepsis post-opératoire a suivi l'augmentation du nombre d'interventions chirurgicales réalisées. Joseph Lister (1827-1912) est né en Angleterre peu avant la publication des observations de Semmelweiss sur la cause du sepsis puerpérale. Il est né de parents ayant un intérêt scientifique ; son père était membre de la Royal Society of Fellows. À l'âge de 17 ans, Lister entre au University College of London et obtient son diplôme de médecine en 1852. Il a accepté un internat en chirurgie à l'infirmerie royale d'Édimbourg, et c'est là qu'il a contesté l'étiologie perçue de la suppuration des plaies qui était largement répandue à l'époque. Malgré les découvertes de Redi et Leeuwenhoek et le système de classification bactérienne développé par Christian Ehrenberg (vers 1838), il était encore largement admis que le sepsis était dû aux contagions de l'air. Lister a astucieusement observé que le sepsis se produisait chez des patients hospitalisés qui avaient des plaies ouvertes et a émis l'hypothèse que les agents infectieux avaient accès au corps par des ouvertures dans la peau. Lister a finalement accepté un poste comme professeur de chirurgie à Glasgow. Il a été nommé responsable d'un nouvel établissement dont le mandat était de réduire le nombre de décès dus au sepsis post-opératoire. Ses premiers efforts à cet égard ont été désastreux puisque 45 à 50 % des patients sont morts d'infections. Parallèlement, Louis Pasteur (1822-1895) menait ses expériences sur la théorie des germes de la maladie. Pasteur faisait bouillir ses préparations (pour les stériliser) dans des flacons dont le col était en forme de cygne et courbé. Il a laissé les flacons ouverts à l'air libre. Les microbes étaient invariablement présents dans le col de la fiole mais n'étaient pas en contact avec la préparation. Dans les flacons où la préparation n'est pas entrée en contact avec les microbes qui se sont accumulés sur le col du flacon, aucune croissance n'a eu lieu et la préparation est restée claire. Pasteur a incliné certains des flacons pour que la préparation soit en contact avec le col de la fiole et les microbes de l'air. Les flacons dont le bout était incliné présentaient constamment un changement dans la préparation, passant de transparent à opaque, ce qui indique une croissance bactérienne. Pasteur a ainsi clairement démontré que la putréfaction exigeait des organismes vivants et a finalement réfuté la théorie de la génération spontanée de la transmission des maladies. En 1878, Pasteur a proposé officiellement à l'Académie française de médecine une " théorie des germes ". Plus tard, il a présenté des données démontrant que les streptocoques sont la cause du sepsis puerpérale. Les nouvelles des expériences de Pasteur sont parvenues à Lister en Angleterre. Cette nouvelle a mené à la formalisation des propres réflexions de Lister concernant la théorie des

germes en relation avec le sepsis des plaies. Lister a émis l'hypothèse que la fermentation démontrée par Pasteur était le même processus que celui observé par Lister chez ses patients atteints de plaies infectées. Lister a ensuite imité l'approche d'une connaissance, un ingénieur qui a réussi à éliminer l'odeur des eaux usées en utilisant de l'acide carbonique. En ajoutant de l'acide carbonique aux pansements, Lister a pu réduire considérablement le taux de sepsis et de décès dans son hôpital. En 1867, Lister a présenté ses recherches à la British Medical Association, démontrant que ses pupilles à l'infirmerie royale de Glasgow étaient exemptes d'infections pendant 9 mois. La même année, The Lancet publiait son article précurseur intitulé " On a New Method of treatin Compound Fracture, Abscess, etc., with Observations on the Conditions of Suppuration,''. Malgré le côté spectaculaire ses résultats, la communauté médicale dans son ensemble a été lente à accepter ses conclusions, ce qui a frustré Lister. Il a écrit : *"Mais l'application de cette règle implique une conviction de la véracité de la théorie des germes de la putréfaction, qui, malheureusement, fait dans ce pays l'objet de doutes tels que je l'avoue me surprennent, vu le caractère des preuves qui ont été apportées à l'appui de celle-ci".* En 1877, comme président du Clinical Surgery in King's College, Lister a présenté sa théorie d'antisepsis au service. Il a pratiquement éliminé l'odeur de sepsis des plaies dans les salles. La même année, sous la technique aseptique, il a effectué une réparation rotulienne ouverte qui s'est avérée réussie et qui n'a pas entraîné de sepsis postopératoire. C'était remarquable à l'époque, car cette opération était associée à un taux de mortalité élevé. La nouvelle de son succès a été largement diffusée et a entraîné un changement de paradigme dans la communauté chirurgicale, ce qui a permis de réduire les complications infectieuses postopératoires. Lister a encore révolutionné le domaine de l'antisepsis en découvrant que les points de suture trempés dans l'acide glycolique réduisaient davantage les infections des plaies. Il est intéressant de noter qu'aux XVe et XVIe siècles, on pensait que les blessures par balle étaient empoisonnées. Pour cette raison, une suture (ou mise en place) a été intentionnellement placée dans la plaie et laissée en place pour faciliter la guérison. Comme beaucoup de scientifiques de son temps, Lister a mené des expériences en s'utilisant comme sujet. Il s'est efforcé de trouver la bonne concentration d'acide glycolique dans les pansements qui fournissaient une quantité adéquate d'antisepsis, sans être caustique pour la peau, un problème qui affectait à la fois les plaies et les mains des chirurgiens. A la même époque que Lister et Pasteur, Robert Koch (1843-1910), qui sera reconnu comme l'un des pères de la microbiologie moderne, travaille également sur la théorie des germes des maladies. Koch a pu démontrer que les moutons infectés par l'anthrax avaient de minuscules organismes en forme de bâtonnets poussant dans leur sang. Il a pu cultiver cet agent avec la gélatine nutritive qu'il a créée. L'inoculation de matériel de culture à des moutons en bonne santé a également entraîné le développement de la maladie du charbon. Koch a ensuite formulé ses fameux postulats sur l'identification des agents infectieux. Koch a dit que pour établir qu'un

agent est la cause de la maladie : (1) l'agent doit être isolé de l'animal malade ; (2) l'agent doit être cultivé in vitro ; (3) l'infection d'un hôte sain par cet agent doit produire la maladie ; et enfin, (4) le même organisme doit être récupéré de l'animal nouvellement infecté. Koch, avec son partenaire Julius Petri (qui a créé la boite éponyme), ont joué un rôle déterminant dans le développement de techniques microbiologiques modernes qui ont permis de faire avancer la théorie germinale de la maladie. Koch est également reconnu pour avoir démontré que la vapeur pouvait stériliser les instruments avec une plus grande efficacité que les désinfectants chimiques du moment. C'est ainsi qu'en 1885, Ernst von Bergmann et Curt Schimmelbusch ont mis au point les premiers autoclaves chirurgicaux, un événement décisif dans le développement de la chirurgie aseptique moderne.

B) Manifestation clinique

La définition de la maladie a été modifiée au cours des ans la première a eu lieu en 1992 puis a été modifié en 2001 et enfin une dernière fois en 2016.

La définition établie en 2001 représentait le sepsis comme la combinaison d'un SRIS (Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique) qui se définit par une infection qu'elle soit bactérienne, virale ou fongique avec la présence d'au moins deux de ces paramètres suivants une température supérieure à 38 °C ou inférieure à 36 °C, une fréquence cardiaque supérieure 90 battements par minute, une fréquence respiratoire supérieure à 20/min ou pression artérielle en Co2 inférieure à 32 mm Hg (4,3 kPa) ou enfin un nombre de globules blancs supérieure 12000/mm3 ou inférieure 4000/mm3 ou supérieure 10% immatures

Ainsi, selon les pays, les études sur le sepsis peuvent impliquer différents agents pathogènes comme le montre la carte publiée dans (Schultz et al., 2017) (Figure 1)

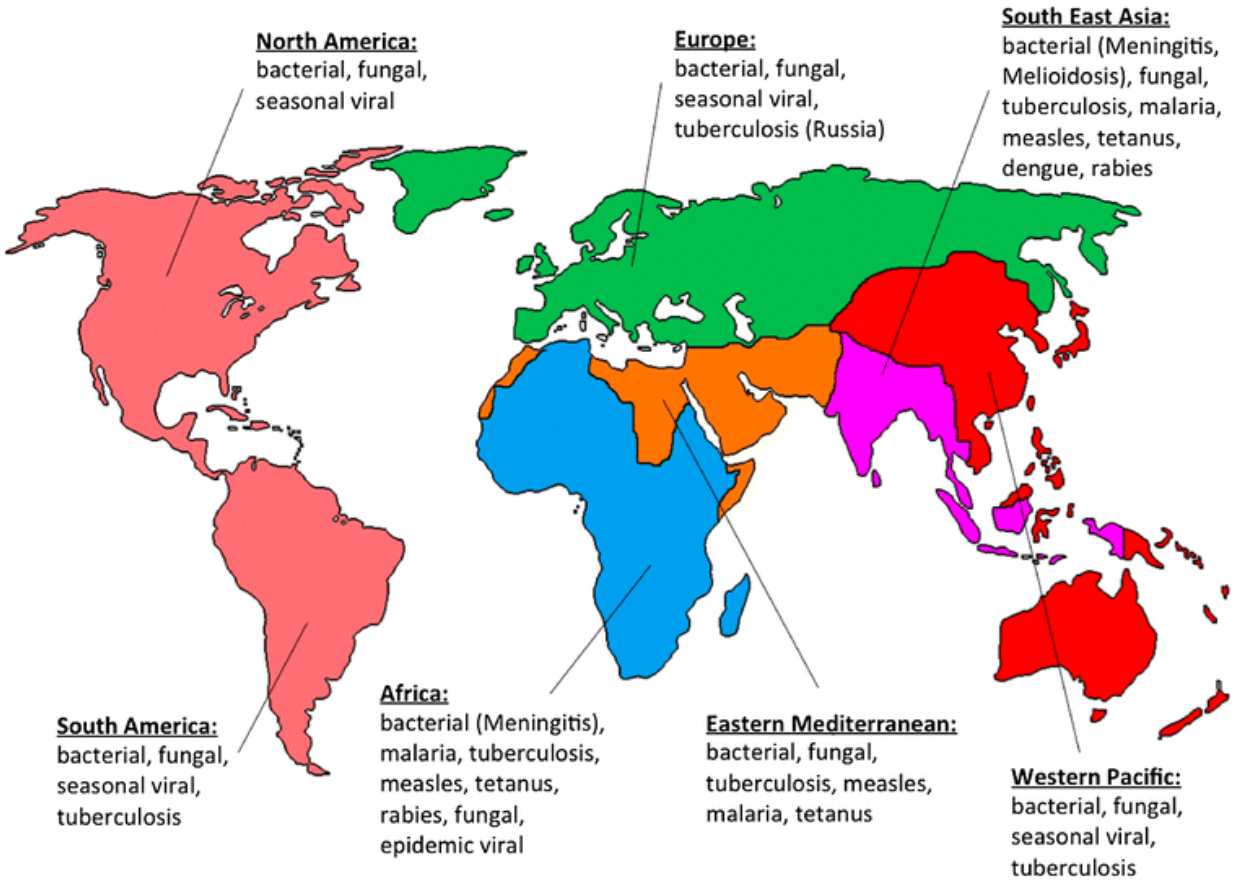


Figure 1 : Les maladies infectieuses les plus pertinentes, telles que rapportées par l'étude Global Burden of Diseases, stratifiées par les six régions de l'Organisation mondiale de la santé. D'après Global Burden of Diseases 2013 et les collaborateurs GBD 2015

Deux formes plus graves de la pathologie était décrites. La première le sepsis sévère (dès l'apparition d'une défaillance d'organe associée) et la seconde le choc septique (défini comme un sepsis sévère ne répondant pas à un remplissage vasculaire adapté = hypotension)

En 2016, lors des Troisièmes définitions consensuelles internationales pour le sepsis et le choc septique (Sepsis-3), une nouvelle définition a été introduite par un groupe de travail de la « Society of Critical Care Medicine » et de la « European Society of Intensive Care Medicine ». Le processus de création d'une nouvelle définition a comporté une analyse de la littérature, la rédaction de critères sur la base d'une méthode delphi (convergences d'opinions afin de dégager certains consensus sur des sujets précis), une analyse « big data » de bases de données hospitalières. Le draft a ensuite été diffusé à de multiples sociétés savantes pour commentaires et approbation.

La nouvelle définition du sepsis c'est basé sur la dysfonction d'organe et le niveau de mortalité observé (Figure 2).

Sepsis :
Il est maintenant défini comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causé par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection.

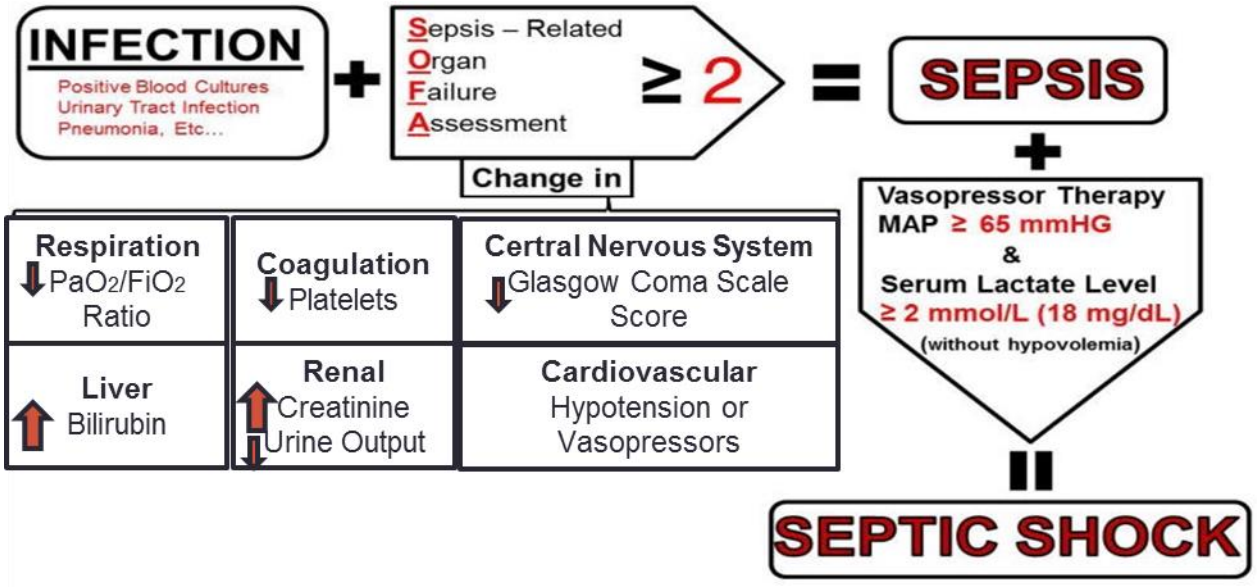


Figure 2 : Nouvelle définition du sepsis défini lors de la troisième définition consensuelle internationale pour le sepsis et le choc septique (Sepsis-3) adapté de (Delano & Ward, 2016b)

Il n'y a plus de séparation sepsis/sepsis grave. Il est aussi proposé une définition opérationnelle pour la défaillance organique, en utilisant le score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment, ou Sequential Organ Failure Assessment) (Tableau 1). Le SOFA basal est supposé être à zéro en l'absence de dysfonction d'organe, aiguë ou chronique, préexistante.

La mortalité hospitalière est estimée autour de 10%, justifiant d'une prise en charge adaptée rapide pour un score SOFA d'au moins 2 points lié à l'infection.

Score SOFA	0	1	2	3	4
Respiratoire: PaO2/FiO2 (mmHg)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 et ventilation mécanique	< 100 et ventilation mécanique
Neurologique: Échelle de Glasgow	15	13–14	10–12	6–9	< 6
Cardiovasculaire: Pression artérielle moyenne OU nécessité d'administrer des vasopresseurs	PAM ≥ 70 mm/Hg	PAM < 70 mm/Hg	dopamine ≤ 5 µg/kg/min OU dobutamine (toute dose)	dopamine > 5 µg/kg/min OU adrénaline ≤ 0.1 µg/kg/min OU noradrénaline ≤ 0.1 µg/kg/min	dopamine > 15 µg/kg/min OU adrénaline > 0.1 µg/kg/min OU noradrénaline > 0.1 µg/kg/min
Hépatique: Bilirubine (mg/dl) [µmol/L]	< 1.2 [< 20]	1.2–1.9 [20-32]	2.0–5.9 [33-101]	6.0–11.9 [102-204]	> 12.0 [> 204]
Coagulation: Plaquettes × 103/µl	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Rénal: Créatinine (mg/dl) [µmol/L] (ou diurèse)	< 1.2 [< 110]	1.2–1.9 [110-170]	2.0–3.4 [171-299]	3.5–4.9 [300-440] (ou < 500 ml/j)	> 5.0 [> 440] (ou < 200 ml/j)

Tableau 1 : Calcul du score SOFA : s'appuie sur six sous-scores, un pour chaque système respiratoire, neurologique, cardiovasculaire, hépatique, rénal et la coagulation. Le tableau ci-dessus donnent la correspondance entre les critères et le nombre de points qui leur sont associés pour chaque sous-score.

Si le paramètre mesuré ne correspond à aucun critère, aucun point n'est attribué. Si le paramètre mesuré correspond à plusieurs critères, le critère valant le plus de points est choisi

Il existe aussi des critères simplifiés, utilisables hors réanimation, sont proposés en dépistage de patients pouvant avoir un sepsis le qSOFA (quick Sepsis-related Organ Failure Assessment) (Tableau 2).

Evaluation clinique	**score quickSOFA**
Hypotension artérielle (Pression Artérielle Systolique ≤ 100 mmHg)	1
Fréquence respiratoire élevée (≥ 22 respirations/min)	1
Altération de conscience (Échelle de Glasgow ≤ 14)	1

Tableau 2 : Calcul du score qSOFA

La présence de 2 critères quick SOFA (qSOFA) identifie des patients risquant d'avoir un mauvais pronostic vital et justifiant d'un monitorage accru, et/ou d'un traitement spécifique et/ou de prendre un avis en réanimation.

Choc septique :

C'est une forme particulière du sepsis qui se caractérise avec des anomalies importantes circulatoires et métabolique et une mortalité d'environ 40%. Il est défini par l'association du sepsis avec l'utilisation de médicaments vasopresseurs pour maintenir une Pression artérielle moyenne supérieure ou égale à 65 mmHg et un niveau de lactates > 2 mmol/l (18mg/dl) malgré un remplissage adéquat

Ces nouvelles définitions ont l'avantage supplémentaire de la simplicité. Un autre avantage est de supprimer la confusion, fréquente en pratique courante, entre sepsis et sepsis grave.

Le SOFA est utilisé en routine en réanimation, et pour les services informatisés, facilement calculé automatiquement. Il devient par contre plus difficile, hors réanimation, de diagnostiquer un choc septique. Le quick SOFA est immédiatement accessible et très intuitif.

A l'échelon individuel, il doit probablement être tempéré par l'état basal du patient (température habituelle et confusion préexistante).

C) Epidémiologie

Une personne meurt de sepsis dans le monde toutes les 3,5 secondes. Le 26 mai 2017, l'Assemblée mondiale de la Santé et l'Organisation mondiale de la Santé ont fait du sepsis une priorité de santé mondiale en adoptant une résolution pour améliorer, prévenir, diagnostiquer et gérer le sepsis. La résolution exhorte les 194 états membres de l'Organisation des Nations Unies à mettre en œuvre des mesures appropriées pour réduire le fardeau économique du sepsis pour la santé humaine. Rien qu'aux Etats-Unis, le sepsis cause ou contribue à la moitié des décès dans les hôpitaux et est devenue la première cause de coûts annuels des hôpitaux, avec plus de 24 milliards USD utilisés par an. La résolution demande également au Directeur général de l'OMS à l'époque, le Dr Margaret Chan, d'attirer l'attention sur l'impact du sepsis sur la santé publique et de 1) publier un rapport sur le sepsis et ses conséquences mondiales d'ici la fin 2018, 2) soutenir adéquatement les États membres, 3) collaborer avec les autres organisations des Nations Unies, et 4) faire rapport à la World Health Assembly 2020 de l'application de la résolution. *"Le sepsis d'origine communautaire et le sepsis causée par les soins de santé représentent un énorme fardeau mondial qui a été estimé à 31 millions de cas chaque année, dont six millions causent la mort* ", a déclaré le Dr Chan. "*Un patient sur dix dans le monde entier contracte une infection associée aux soins de santé qui se manifeste souvent par des sepsis."*

L'OMS a alloué 4,6 millions de dollars US pour aider à la mise en œuvre de la résolution du sepsis. L'adoption du sepsis comme priorité mondiale a été initiée par la Global Sepsis Alliance qui a recueilli le consensus et l'autorité des cliniciens et des familles de plus de 70 pays. "*Dans le monde entier, le sepsis est l'une des maladies mortelles les plus courantes et l'une des rares conditions à frapper avec autant de férocité dans les régions pauvres en ressources que dans les pays développés* ", a déclaré le Dr Konrad Reinhart, Président de la Global Sepsis Alliance. "*Dans les pays développés, le taux de sepsis a augmenté de 5 à 13 % par an au cours de la dernière décennie, et le nombre de décès est maintenant plus élevé que celui des cancers du sein et de l'intestin réunis. Lorsque le sepsis est rapidement reconnu et traité, des vies sont sauvées, mais les fournisseurs de soins de santé ont besoin d'une meilleure formation parce qu'ils sont le lien essentiel pour prévenir, reconnaître et traiter le sepsis*". En effet, dans les pays industrialisés, le sepsis représente autant de décès que l'infarctus du myocarde : on y dénombre 95 cas de sepsis pour 100 000 habitants pour les moins de 65 ans, et 1220 cas pour les plus de 65 ans. Dans les pays en développement, le sepsis puerpéral demeure une cause de mortalité importante des femmes après leur accouchement (18 000 décès par an). Quant au sepsis néonatal, on estime qu'il est à l'origine de plus de 350,000 décès parmi les nouveau-nés dans le monde. En France, la mortalité des patients atteints d'un sepsis est de 27%, mais la mortalité de la forme la plus grave (le choc septique) est

de 40% à 50%. On estime à 30,000 le nombre de décès consécutifs au sepsis en France. Les projections dans l'avenir suggèrent un doublement du nombre de cas d'ici cinquante ans, s'expliquant notamment par le vieillissement de la population. Malgré ces chiffres impressionnants, le sepsis reste loin derrière d'autres affections en termes de priorités pour la recherche : alors que dans les pays industrialisés, le sepsis concerne 1,8 fois plus de personnes que les maladies cardiaques, les fonds investis en recherche sur le sepsis sont, eux, 13 fois moindres que ceux affectés pour les maladies du cœur, et 32 fois moindres que les sommes investies dans la recherche sur le SIDA. Espérons que la reconnaissance par l'OMS du sepsis comme une priorité de santé publique fera évoluer ces chiffres.

Il a été démontré que l'état du patient et la réponse immunitaire de l'hôte est primordiale dans le développement de la pathologie.

LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE L'HÔTE

Le sepsis a un impact direct sur le système immunitaire en modifiant la durée de vie, la production et la fonction des cellules effectrices responsables de l'homéostasie (Bosmann & Ward, 2013; Delano & Moldawer, 2009). Le compartiment hématopoïétique reconstitue les cellules innées et adaptatives différenciées qui sont intrinsèquement responsables de la surveillance immunitaire contre les agents pathogènes et, en même temps, indispensables à la régénération tissulaire et à la cicatrisation. Au cours des deux dernières décennies, un débat a persisté sur la question de savoir si le dysfonctionnement immunitaire inné et adaptatif ou les processus inflammatoires et anti-inflammatoires sont préjudiciables à la survie au sepsis (Richard S Hotchkiss, Coopersmith, Mcdunn, & Ferguson, 2009). Auparavant, on croyait que la réponse inflammatoire était à l'origine de la mortalité précoce (au cours des premiers jours de sepsis), et que la réponse anti-inflammatoire compensatoire induit, lors de la dysfonction des organes, la suppression immunitaire et la mortalité des semaines plus tard (Bone, Grodzin, & Balk, 1997) (Figure 3).

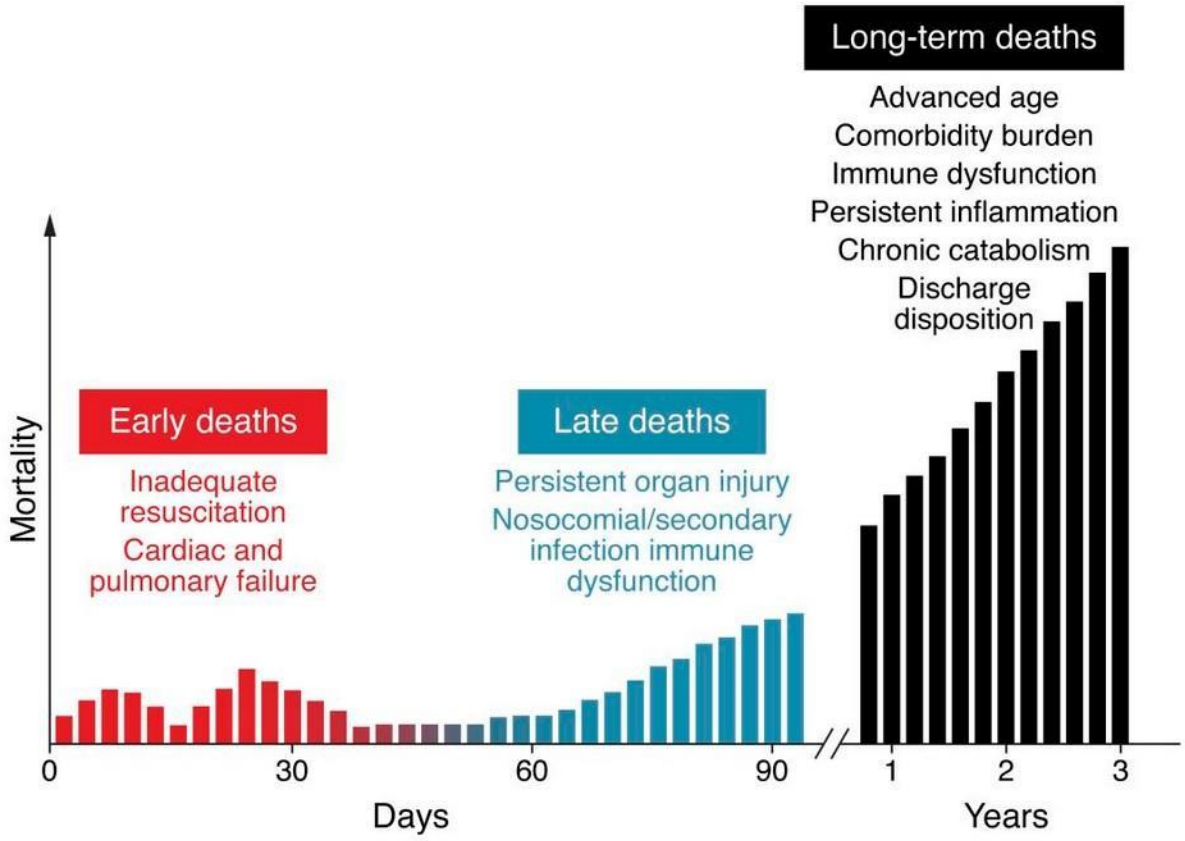


Figure 3 : Répartition actuelle de la mortalité due à la septicémie.
Les deux pics précoces de mortalité existent, bien qu'avec une ampleur beaucoup plus faible que par le passé. La troisième poussée se produit environ 60 à 90 jours après la septicémie et continue de monter en flèche avec le temps. On croit que ce retard dans la mortalité due à la septicémie est la conséquence des soins intensifs plus sophistiqués qui permettent aux patients âgés et aux patients aux prises avec des

problèmes de comorbidité de vivre plus longtemps malgré les aberrations immunitaires, physiologiques et biochimiques continues d'après Delano (Delano & Ward, 2016a)

Cependant, de nouvelles données recueillies par l'analyse génomique d'échantillons de tissus de patients atteints d'une infection (Boomer et al., 2011) et de traumatismes graves ont permis d'identifier un état inflammatoire et anti-inflammatoire durable et simultané causé par une immunité adaptative et innée dysfonctionnelle et/ou supprimée qui, ensemble, aboutit à des lésions tissulaires persistantes (Figure 4) (Rittirsch, Flierl, & Ward, 2008) et au décès du patient (Cuenca et al., 2013; Xiao et al., 2011).

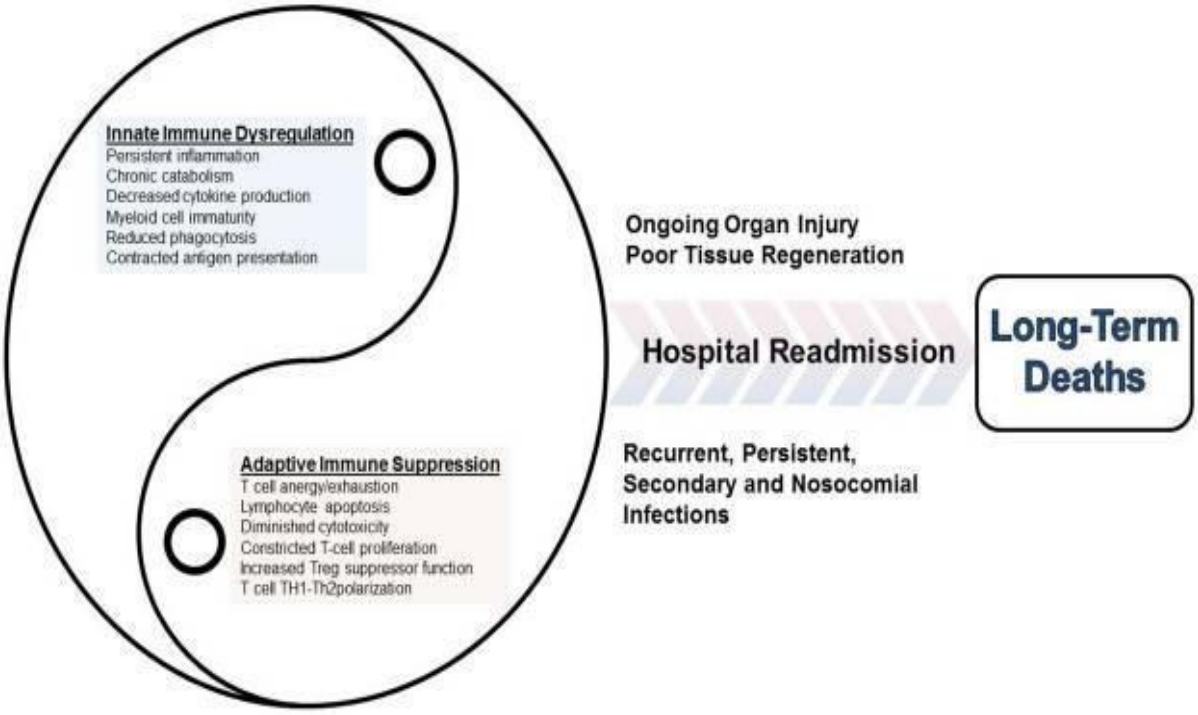


Figure 4 : L'équilibre des réponses inflammatoires versus anti-inflammatoires dans le développement du sepsis
De nouvelles données recueillies à partir d'échantillons de tissus de patients atteints de sepsis et de traumatismes graves ont permis d'identifier un état inflammatoire et anti-inflammatoire durable et simultané causé par une immunité adaptative innée dysfonctionnelle et supprimée qui, ensemble, aboutit à des lésions organiques persistantes, des complications infectieuses nécessitant une réadmission en hôpital et finalement la mort du patient. Il est évident que les réponses inflammatoires et anti-inflammatoires et les systèmes immunitaires inné et adaptatif sont tous deux aussi importants les uns que les autres, continuellement dans un état de fluctuation et toujours en désaccord les uns avec les autres, à mesure que la guérison du sepsis progresse. Cet état perpétuel de yin et de yang immunologiques est censé entraîner une inflammation continue, faciliter les lésions organiques et permettre des complications infectieuses qui empêchent toute survie durable à le sepsis. Adapté de (Delano & Ward, 2016b)

Chacune de ces études s'intéresse à un aspect de la pathologie, lorsque les résultats collectifs sont comparés aux résultats des patients, il est clair qu'un changement de paradigme est nécessaire pour expliquer la poussée de mortalité à long terme après un sepsis. Il est évident que les réponses inflammatoires et anti-

inflammatoires et les systèmes immunitaires inné et adaptatif sont tous deux d'égale importance, et il est probable qu'ils constituent des cibles actuelles pour les futures thérapies immunitaires (Figure 5) visant à améliorer les résultats à long terme du sepsis (Bosmann & Ward, 2013; Delano & Moldawer, 2009; Richard S. Hotchkiss, Monneret, & Payen, 2013; Hutchins, Unsinger, Hotchkiss, & Ayala, 2014). La discussion qui suit donne un aperçu des modifications induites par le sepsis et dans l'inflammation, la fonction immunitaire innée et adaptative des cellules et les modifications de la réponse immunitaire les plus prometteuses qui peuvent être envisagées pour le traitement futur du sepsis chez l'humain.

De plus étant donné l'importance de la morbidité, de la mortalité et des coûts associés au sepsis et aux traumatismes, les cliniciens et les chercheurs ont déployé des efforts considérables pour mieux comprendre la physiopathologie sous-jacente de ces processus pathologiques, souvent au moyen de modèles animaux. L'espèce la plus couramment utilisée pour la recherche sur les traumatismes et le sepsis a été la souris *Mus musculus* (Fink 2014). À partir d'études précliniques chez la souris, plus d'une centaine de thérapies prometteuses ont été mises au point qui ciblent les voies inflammatoires ou immunosuppressives dans le but de prévenir ou d'atténuer la réponse inflammatoire ou de stimuler une immunité protectrice. Malgré cela, ces agents thérapeutiques n'ont universellement pas réussi à démontrer leur efficacité chez l'humain malgré des résultats préliminaires prometteurs dans les modèles animaux (Dyson et Singer 2009 ; Fink 2014 ; Zanotti-Cavazzoni et Goldfarb 2009). Non seulement les thérapies proposées sont largement inefficaces, mais dans certains cas, elles aggravent paradoxalement les résultats pour les patients, ce qui entraîne l'interruption précoce des essais cliniques. Jusqu'à présent, aucun agent thérapeutique démontrant l'efficacité de modèles animaux précliniques de sepsis ou de traumatisme n'est actuellement utilisé dans la pratique clinique, ce qui oblige plusieurs chercheurs à remettre en question la valeur des modèles animaux.

Bon nombre des connaissances actuelles ont été tirées du modèle de sepsis animal qui récapitule les aspects du sepsis humaine. Nous pouvons discuter du débat continu sur l'efficacité des modèles murins et d'autres modèles animaux pour refléter avec précision les processus pathologiques humains. Même si les animaux ne sont pas immunologiquement, métaboliquement ou génomiquement similaires à l'état des réponses humaines, il n'est pas faisable de simplement tester toutes les hypothèses proposées dans les systèmes de maladies humaines sans le bénéfice de la corrélation animale pour explorer des voies scientifiques qui ne seraient pas autrement éthiquement acceptables pour la condition humaine.

A) Hyperinflammation

Une fois que l'hôte perd le confinement local d'une infection, le reste du corps est systématiquement exposé aux pathogènes, aux composants pathogéniques et aux

produits des tissus endommagés. Ceci induit une réponse inflammatoire et initie des réponses de type septique par la reconnaissance des pathogènes et des tissus endommagés au moyen de récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) qui sont omniprésents à la surface des cellules immunitaires. Les PRR s'expriment principalement sur les cellules immunitaires et phagocytaires et sur de nombreux types de tissus somatiques. Les infections microbiennes sont reconnues par les modèles moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) qui sont exprimés par des microbes pathogènes et inoffensifs. Les PAMP sont reconnus par les PRR tels que les récepteurs de type Toll (TLR), les récepteurs de lectine de liaison de type C et mannan, les récepteurs de type NOD et les récepteurs de type RIG-I. Les protéines et les produits cellulaires libérés par les lésions tissulaires sont également reconnus comme des modèles moléculaires associés aux lésions (DAMP) (Janeway Jr. & Medzhitov, 2002). Au cours d'un sepsis ou d'une infection, l'activation systémique du système immunitaire inné par les PAMP et les DAMP entraîne une réponse inflammatoire grave et persistante caractérisée par une libération excessive de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF, l'IL-6 et l'IL-17, connues collectivement sous le nom de "tempête des cytokines" (Rittirsch et al., 2008). La libération exorbitante de cytokines inflammatoires se produit sur une période relativement courte (plusieurs jours) voir figure 5. De plus, l'activation intense du complément et la stimulation immunitaire innée potentialisent ce qui devrait être une réponse physiologique normale à l'infection, plutôt qu'une réponse inflammatoire excessive entraînant des dommages tissulaires, des défaillances cellulaires et une dysrégulation moléculaire qui peuvent déclencher une dysfonction organique voir même une défaillance multi-organique (Rittirsch et al., 2008).

B) Résolution immunitaire

On croyait que la résolution de la cascade de cytokines hyperinflammatoires commençait quelques jours après le début de l'épisode initial de sepsis. Cependant, récemment, on a découvert que les voies anti-inflammatoires compensatoires sont activées peu de temps après le début de sepsis (Richard S Hotchkiss et al., 2009). La cytokine caractéristique est l'IL-10, qui est produite par une variété de leucocytes, supprimant la production d'IL-6 et d'interféron-γ (IFNγ), et stimulant la production du récepteur soluble du TNF et de l'antagoniste du récepteur IL-1. Ces produits neutralisent la signalisation pro-inflammatoire TNFα et IL-1 (Gilroy & Vallance, 2005). Au niveau sous-cellulaire, l'autophagie permet d'éliminer les DAMP et les PAMP en conditionnant les composants pathogènes, les organites endommagés et les protéines cellulaires dans des vésicules ciblées pour la dégradation lysosomale, ce qui réduit l'inflammation et l'activation cellulaire (Fullerton & Gilroy, 2016).

La résolution de l'inflammation après une infection grave n'est pas simplement un processus passif visant à freiner la production de cytokines et à faciliter les voies inflammatoires. L'atténuation de l'inflammation implique plutôt un ensemble

complexe et de processus cellulaires coordonnés et de signaux moléculaires récemment reconnus. Peu après l'élimination des bactéries pathologiques de l'hôte, les tissus, cellules et leucocytes endommagés doivent être éliminés du site d'infection. Dans des circonstances favorables, les cellules tissulaires et les leucocytes défonctionnalisés subissent l'apoptose et sont engloutis par les macrophages et retirés de la région inflammatoire, déclenchant la production d'IL-10 anti-inflammatoire et le facteur de croissance transformant β (TGFβ). En outre, les lipides bioactifs récemment découverts, appelés lipoxines, résolvines, protectines et maresins ont montré leur capacité de réduire les ROS, la perméabilité endothéliale, le recrutement leucocytaire, ainsi que le phagocytosis des macrophages (Buckley, Gilroy, & Serhan, 2014; Serhan, 2014). En plus des cytokines anti-inflammatoires, la résolution de l'inflammation est également régie par de multiples sous-ensembles de cellules immunitaires régulatrices telles que les cellules T régulatrices (Tregs) (Venet et al., 2008, 2009) et les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) qui orchestrent l'inhibition des effets cytokines et réduisent la production des cytokines inflammatoires (Brudecki, Ferguson, McCall, & Gazzar, 2012).

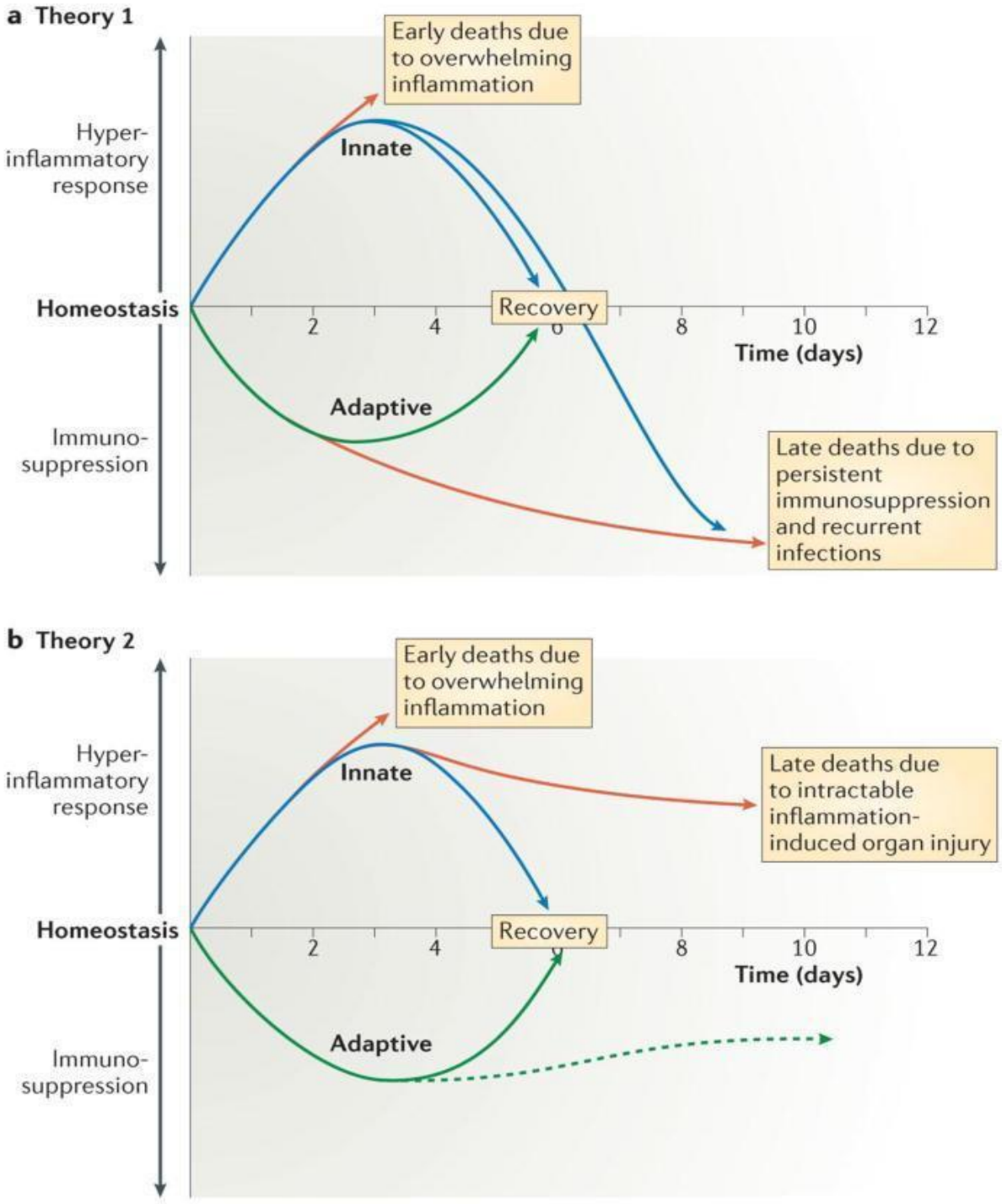


Figure 5 : Conception classique des réponses pro et anti-inflammatoires lors du sepsis
(Théorie #1) : Des réponses pro et anti-inflammatoire se mettent rapidement en place après le début du sepsis. Les cellules composant le système immunitaire inné comme les polynucléaires neutrophiles (PNN), les monocytes et les cellules dendritiques (DCs) libèrent rapidement de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (ligne bleue : jour 0 à 3). Les morts précoces liées au sepsis (flèche rouge en haut du schéma, jour 3) sont dus à cet "tempête cytokinique" et à la réponse hyperinflammatoire. La plupart des patients survivent à l'infection initiale grâce à un retour à des réponses immunitaires innées et adaptatives appropriées (homéostasie) (lignes bleues et vertes, J6). Lorsque le sepsis persiste, on peut parfois observer un échec de la régulation des réponses innées et adaptatives conduisant à une immunosuppression profonde. Cet état est à risque d'aggravation de l'infection primaire, d'apparition

d'infections nosocomiales secondaires et/ou de réactivations virales responsables de décès plus tardifs (lignes bleues et rouges, après J6) (Théorie #2) : Une théorie concurrente du sepsis reconnaît qu'il y a une activation précoce de l'immunité innée et une suppression de l'immunité adaptative. Selon cette théorie, les décès dans les cas de sepsis sont dus à l'activation persistante de l'immunité innée et à l'inflammation intraitable et aux lésions organiques qui en résultent. Selon cette théorie, les décès tardifs dans les cas de sepsis sont dus à une inflammation persistante sous-jacente induite par le système immunitaire inné. (Hotchkiss, Monneret, & Payen, 2013)

Historiquement, les interventions thérapeutiques visant à inhiber la réponse inflammatoire aiguë à l'infection et au sepsis subséquente à l'aide de glucocorticoïdes, d'agents anti-inflammatoires non stéroïdiens et d'anticorps antiTNFα n'ont jamais réussi à améliorer les résultats de survie chez les patients septiques et en état de choc septique (Marshall, 2014). Inversement, les stratégies qui stimulent les médiateurs endogènes qui résolvent activement l'inflammation n'ont pas été explorées parce que les facteurs de signalisation critiques qui régulent ces processus endogènes sont restés insaisissables. Serhan et al ont démontré que les lipides dérivés de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA), augmentent tôt après les états infectieux, régulent la résolution inflammatoire et augmentent la clairance bactérienne (Serhan, 2014). Récemment, Dalli et ses coauteurs ont rapporté une nouvelle cohorte de lipides protecteurs de l'hôte appelée résolvines de la série 13 (RvTs) (Dalli, Chiang, & Serhan, 2015). Ces lipides protecteurs de l'hôte se forment tôt au cours de l'inflammation, favorisent la phagocytose bactérienne, augmentent la production d'espèces réactives de l'oxygène et augmentent le rétablissement de l'hôte après une infection systémique en accélérant la résolution de l'inflammation aiguë (Dalli et al., 2015). De plus, l'administration systémique d'atorvastatine peut augmenter la biosynthèse RvT par l'activation de COX-2 et accélérer la résolution de l'infection qui peut être inversée par l'inhibition de COX-2 par le célécoxib (Dalli et al., 2015). Ensemble, ces résultats mettent en lumière un nouveau groupe de médiateurs endogènes qui résolvent l'inflammation de l'hôte sans interférer avec la phagocytose et identifient un nouveau mécanisme pour les effets pléiotropes des statines qui atténuent l'inflammation et favorisent la fonction endothéliale (Lee & Zeldin, 2015). Bien que la thérapie par les statines dans le traitement du sepsis n'ait apporté que peu d'avantages dans les essais cliniques (Deshpande, Pasupuleti, & Rothberg, 2015), la découverte d'une nouvelle classe de lipides bioactifs qui résolvent l'inflammation pourrait fournir un biomarqueur pour identifier les sous-groupes dont la biosynthèse RvT est altérée et qui pourraient bénéficier de la thérapie par statines.

C) Suppression immunitaire

En général, les stratégies thérapeutiques pour traiter le sepsis sont axées sur l'inhibition de la phase hyperinflammatoire précoce. Cependant, il est évident qu'un état de suppression immunitaire existe en même temps qu'une inflammation persistante et permet le développement d'infections persistantes, récurrentes, secondaires et nosocomiales qui entraînent des résultats moins bons et une mortalité à long terme accrue (Richard S. Hotchkiss et al., 2013). La suppression immunitaire induite par le sepsis a un impact sur les effecteurs cellulaires du système immunitaire inné et du système immunitaire adaptatif.

Les neutrophiles, essentiels à l'éradication bactérienne, présentent des défauts de chemotaxie et de recrutement aux sites d'infection, dans le cadre d'un sepsis (Cummings et al., 1999 ; Kovach & Standiford, 2012). De plus, la production et la libération de molécules effectrices essentielles, comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les cytokines, sont considérablement altérées (Grailer, Kalbitz, Zetoune, & Ward, 2014 ; M. Huber-Lang et al., 2001 ; Kovach & Standiford, 2012), ce qui entraîne la persistance bactérienne et le développement de complications infectieuses. Même si la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules myéloïdes est réduite, la production globale de cellules myéloïdes et la libération de cytokines anti-inflammatoires (ex. IL-10) sont élevées (Grailer et al., 2014). Les défauts de la fonction des cellules présentatrice de l'antigène (APC), y compris une expression HLA-DR réduite, une tolérance aux endotoxines et une production de cytokines altérée, réduisent la capacité des APC à stimuler les fonctions immunitaires dirigées par les lymphocytes après une infection/sepsis (Benjamim, Lundy, Lukacs, Hogaboam, & Kunkel, 2005 ; Cavaillon & Adib-Conquy, 2005 ; D. Grimaldi, Llitjos, & Pène, 2014 ; Pène et al., 2008; Alingrin et al., 2018). L'apoptose des lymphocytes et des cellules APC (cellules dendritiques, lymphocytes T et lymphocytes B) est considérée comme une marque de suppression immunitaire septique (Richard S. Hotchkiss et al., 1999, 2002).

En plus de la diminution de la fonction innée, l'immunité adaptative est également affaiblie. Les splénocytes prélevés sur des patients septiques décédés présentent un nombre réduit de lymphocytes CD4+ et CD8+ qui émanent d'une apoptose importante (Boomer et al., 2011). De plus, la perte de cellules CD4+ est associée à une capacité réduite de préparer des réponses immunitaires appropriées aux infections virales, y compris le cytomégalovirus, le virus d'Epstein-Barr, le virus de l'herpès simplex et le virus de l'herpès humain qui se réactivent après des épisodes infectieux (Walton et al., 2014). Cependant, la réduction du nombre de lymphocytes ne reflète pas seulement le risque de réactivation virale à la suite d'un sepsis. La lymphopénie quatre jours après l'apparition du sepsis est associée au développement d'une infection secondaire et est prédictive de la mortalité à long terme un an après le sepsis (Drewry et al., 2014).

Dans l'ensemble, ces altérations cellulaires spécifiques se transforment en un état chronique de suppression immunitaire, caractérisé par des complications infectieuses persistantes, récurrentes, secondaires et nosocomiales (Otto et al., 2011), entraînant souvent des réadmissions à l'hôpital (D. W. Chang, Tseng, & Shapiro, 2015 ; Jones et al., 2015 ; Prescott, Langa, & Iwashyna, 2015) et une faible survie à long terme (Jensen, Knudsen, Wehberg, Gregson, & Laupland, 2011). Au cours des cinq dernières années, il est devenu tout à fait clair que dans les semaines et les mois qui ont suivi le départ de l'hôpital, les survivants du sepsis ont des taux de réadmission augmenté (Prescott, Dickson, Rogers, Langa, & Iwashyna, 2015) en raison de complications infectieuses (Prescott, 2016), nécessitant plus d'antibiotiques, de jours aux soins intensifs et de ressources hospitalières, comparativement aux patients ne souffrant pas du sepsis (A. Sun et al., 2016). Compte tenu de l'augmentation constante du nombre de personnes âgées aux prises avec des problèmes de comorbidité et présentant une inflammation persistante, une suppression immunitaire et une sénescence immunitaire, on prévoit que le nombre de survivants du sepsis qui développent des infections subséquentes augmentera considérablement au cours des prochaines décennies (Jensen et al., 2011 ; Leibovici, 2013). Le sepsis induit un état pathologique de suppression immunitaire qui provoque le développement d'infections secondaires alors qu'elle est encore en soin intensif (Van Vught et al., 2016). Plusieurs rapports au cours des cinq dernières années démontrent que les survivants du sepsis connaissent des taux considérablement plus élevés d'infections subséquentes longtemps après la résolution de l'épisode initial du sepsis (Prescott, Langa, et al., 2015 ; Søgaard, Thomsen, Bang, Schønheyder, & Nørgaard, 2015 ; Suzuki et al., 2016 ; T. Wang et al., 2014). L'augmentation des taux de réadmission à l'hôpital en raison de complications infectieuses chez les survivants de sepsis est un signe de suppression et de dysrégulation immunitaires continues qui, si elles ne sont pas corrigées, diminuent la qualité de vie et la survie durable.

D) Modifications moléculaires dans le sepsis

Les observations actuelles sur le sepsis suggèrent que la défaillance de plusieurs organes se produit même dans le contexte d'une morphologie cellulaire préservée et en l'absence de lésions cellulaires importantes. De plus, le dysfonctionnement des organes est souvent réversible, même dans les organes qui se régénèrent mal (cœur, poumons, système nerveux central, reins). Par conséquent, le dysfonctionnement d'organe induit par le sepsis se produit principalement par dysrégulation cellulaire et moléculaire, par opposition à des dommages tissulaires importants. Selon ce principe, le dysfonctionnement immunitaire dans le sepsis est également associé à des altérations moléculaires qui modifient le phénotype et la fonction cellulaire. Ci-dessous, plusieurs voies importantes de dysfonctionnement

cellulaire qui influent sur la fonction immunitaire pendant et après des épisodes infectieux/sepsis sont décrites.

- **Activation du complément**

On sait depuis longtemps dans les modèles de sepsis chez l'humain et les rongeurs qu'une baisse marquée du complément plasmatique hémolytique se produit et apparaissent des produits d'activation du complément dans le plasma (Martin, 2012). Il est également prouvé que le sepsis chez l'homme provoque l'excrétion du récepteur C5a dans le plasma, probablement en raison de la libération de microparticules de neutrophiles. Des événements semblables se produisent chez les rats et les souris atteints de sepsis expérimental polymicrobien (Czermak et al., 1999). En plus de l'activation du complément, il y a aussi une forte stimulation du système fibrinolytique et du système de coagulation (M. S. Huber-Lang et al., 2001). Il existe également des preuves de l'activation de plusieurs facteurs de coagulation, dont certains ont des activités C3 et C5 convertase, générant C3a ainsi que l'activation de la thrombine qui a une activité C5 convertase et génère C5a et le complexe d'attaque membranaire terminal (MAC) (Czermak et al., 1999). Il est bien établi que l'activation du système du complément est souvent liée à l'activation du système de coagulation et du système fibrinolytique. La mise au point d'anticorps neutralisants C5a dans des modèles murins a considérablement atténué l'intensité du sepsis, notamment en améliorant considérablement la survie à 7 jours, en réduisant les taux de cytokines plasmatiques et en diminuant la défaillance de plusieurs organes (Czermak et al., 1999 ; M. S. Huber-Lang et al., 2001 ; P. A. Ward, 2010). Les progrès constants réalisés dans la compréhension du complément et de la façon dont sa production et son dépôt augmentent l'inflammation systémique, l'insuffisance organique et la mortalité ont mené au développement et à l'essai randomisé de phase 2 d'un inhibiteur du C5a, qui s'est révélé très prometteur malgré un vaste champ historique d'autres anticorps bloquants (Melis et al., 2015).

- **Déséquilibre Redox**

Des données cliniques et expérimentales bien publiées démontrent que les patients septiques présentent un stress oxydatif important (Cowley et al., 1996 ; Ogilvie, Groeneveld, Straub, & Thijs, 1991 ; Santos et al., 2012) qui résulte d'une production incontrôlée de ROS et d'espèces azotées réactives (RNS). Cet état grave de stress oxydatif est produit par des cellules immunitaires et épithéliales activées qui surexpriment les oxydes synthases, y compris l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), ou par production mitochondriale de ROS (Andrades, Morina, Spasić, & Spasojević, 2011 ; Ojeda Ojeda et al., 2011 ; Santos et al., 2012). Les ROS et les

RNS jouent un rôle crucial dans la progression du sepsis en interférant avec les cascades de signalisation de l'oxyde nitrique et l'oxydation/nitrosylation des protéines ou des substrats d'acide nucléique qui entraîne une fonction moléculaire nocive (Andrades et al., 2011; Dare et al., 2009).

- **Ca2+ Homéostasie**

L'hypocalcémie est fréquente dans les cas de sepsis et est en corrélation avec des scores SOFA spécifiques de la maladie (Desai, Carlson, & Geheb, 1988 ; M.M., 2000 ; Müller et al., 2000 ; Zivin, Gooley, Zager, & Ryan, 2001). On suppose que l'altération de la concentration intracellulaire du calcium est le possible responsable de l'hypocalcémie systémique observée (M.M., 2000). Bien que les taux de Ca2+ systémique soient réduits pendant le sepsis, il y a une augmentation des taux cytosoliques de Ca2+ qui peut découler d'une absorption accrue. Les mêmes fluctuations intracellulaires du calcium sont élevées dans une variété de tissus et de types de cellules pendant le sepsis (S. K. Song, Karl, Ackerman, & Hotchkiss, 1993 ; Thompson et al., 2000 ; Zaloga, Washburn, Black, & Prielipp, 1993). Bien que les mécanismes spécifiques qui sous-tendent la manipulation altérée du Ca2+ demeurent incertains. L'augmentation du calcium intracellulaire entraîne des réponses inflammatoires élevées, un dysfonctionnement cellulaire et peut même être cytotoxique. De plus, l'accumulation de Ca2+ dans les organes pendant le sepsis est également associée à un dysfonctionnement important des organes (Collage et al., 2013).

- **Activation des PARP1 et PARP2**

Poly(ADP-Ribose) Polymérase 1 (PARP1) et PARP2 sont des enzymes qui catalysent la poly(ADP-robosylation) des protéines. L'activité catalytique de ces enzymes est stimulée par la rupture des brins d'ADN. L'activité du PARP est considérée comme un senseur de dommages à l'ADN. L'activation PARP1 et le déclenchement de la réponse inflammatoire se produisent simultanément (Ba & Garg, 2011). L'activité PARP1 régule à la hausse l'expression des gènes pro-inflammatoires (Liaudet & Oddo, 2003), ce qui est attribué aux altérations induites par PARP1 dans la structure de la chromatine et dans la régulation transcriptionnelle (Ba & Garg, 2011; Wongsrichanalai, Namsiripongpun, Pornsilapatip, Kyle, & Wilde, 1992). Comme le PARP1 contribue aussi directement à la mort cellulaire dans les tissus affectés (Ba & Garg, 2011), on suppose que le PARP1 joue également un rôle dans la mort cellulaire immunitaire associée à le sepsis. La déficience génétique PARP1 est protectrice dans les modèles murins de sepsis expérimentale et est

associée à des niveaux de cytokines plasmatiques significativement réduits et à une réduction des dysfonctionnements tissulaires/organes (Soriano et al., 2002).

- **Dysfonctionnement mitochondrial**

Les mitochondries sont essentielles au maintien d'un approvisionnement adéquat en ATP pour les processus cellulaires. De plus, les mitochondries endommagées peuvent déclencher des voies de mort cellulaire par la libération de cytochrome c (Richard S. Hotchkiss, Strasser, McDunn, & Swanson, 2009). Les mitochondries sont affectées de plusieurs façons pendant le sepsis. La production de quantités excessives de ROS et de RNS peut inhiber directement la respiration et endommager les composants de la chaîne respiratoire des mitochondries (Brealey et al., 2002 ; Larsen, Schiffer, Weitzberg, & Lundberg, 2012). De plus, une altération de la perfusion tissulaire (due à une perte de liquide, à la fois intrinsèque et extrinsèque, ainsi qu'à un tonus vasculaire réduit) entraîne une hypoxie tissulaire. La perte d'oxygénation des tissus réduit considérablement la phosphorylation oxydative et peut déclencher des voies de mort cellulaire (Srinivasan & Avadhani, 2012). Le dysfonctionnement mitochondrial, ou l'endommagement direct des mitochondries, peut affecter directement la production d'ATP. Non seulement la baisse de l'ATP affectera négativement les processus cellulaires, mais un manque sévère d'ATP peut déclencher une anergie cellulaire, ce qui fait que la cellule ne mourra pas nécessairement, mais acquerra plutôt un état d'hibernation entraînant un dysfonctionnement tissulaire et une défaillance des organes (Singer, 2014). L'importance du dysfonctionnement mitochondrial pendant le sepsis est soulignée par les observations selon lesquelles les taux cellulaires d'ATP sont corrélés à la survie dans les modèles inflammatoires de sepsis humaine et animale (Brealey et al., 2002, 2004).

E) Défauts cellulaires

La discussion qui suit résume les altérations immunitaires induites par le sepsis dans la majorité des types de cellules innées et adaptatives, ainsi que les candidats les plus prometteurs à l'étude pour être utilisés comme modificateurs de la réponse immunitaire dans le traitement futur du sepsis humain.

- **Immunité innée**

- Endothélium

Les cellules endothéliales (CE) forment une seule couche cellulaire appelée endothélium, qui tapisse tous les systèmes vasculaire et lymphatique de l'organisme

et constitue une barrière semi-perméable entre le sang et la lymphe dans les vaisseaux et le tissu environnant. Les CE sont une population hétérogène de cellules qui répondent à de nombreux processus physiologiques et participent à des réponses immunitaires innées et adaptatives. Les CE fonctionnent comme des capteurs de signaux de danger et sont donc l'un des premiers types de cellules à détecter les microbes envahisseurs par l'intermédiaire de signaux de danger liés au métabolite endogène dans la circulation sanguine (Opitz, Eitel, Meixenberger, & Suttorp, 2009). L'exposition aux LPS active les CE, ce qui entraîne la production de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires, qui amplifient la réponse immunitaire en recrutant des cellules immunitaires (Faure et al., 2000). Par conséquent, les CE fonctionnent comme des multiplicateurs de force innée, des mobilisateurs cellulaires et des régulateurs immunitaires en modulant la fonction cellulaire (Ince et al., 2016). Dans des circonstances particulières, les CE peuvent servir de cellules présentatrices d'antigène exprimant à la fois les molécules des CMH I et II et les antigènes endothéliaux des cellules T. Les CE expriment également les TLR-2 et TLR-4, ce qui leur permet de répondre aux LPS dans les états d'infection bactérienne (Faure et al., 2000).

Au cours d'un sepsis, une quantité importante de dysfonctionnement des CE sont présentes et se manifestent sous la forme de plusieurs processus pathologiques, notamment une fuite capillaire, une altération du tonus vasomoteur et une thrombose microvasculaire (Colbert & Schmidt, 2016). Une autre conséquence des lésions de l'endothélium est la libération de quantités pathologiques du facteur von Willebrand, qui favorise l'agrégation plaquettaire et l'adhésion à la couche sous-endothéliale et la formation de thrombus pathologiques. En cas de sepsis, il peut y avoir destruction directe de la barrière endothéliale et une augmentation du nombre de cellules endothéliales circulantes observées chez les patients en état de choc septique. L'angiopoïétine-2 (Ang-2) est un médiateur de la fuite microvasculaire endothéliale et un prédicteur indépendant de la mort et du dysfonctionnement des organes pendant une sepsis (Mikacenic et al., 2015). Étant donné que le résultat précoce d'un sepsis est principalement déterminé par le degré de défaillance d'un organe, un dysfonctionnement endothélial macro- et microvasculaire a été proposé comme biomarqueur précoce de la fonction et du résultat immunitaires. Chez les patients atteints de sepsis, le dysfonctionnement endothélial mesuré in vivo coïncide avec une diminution du nombre et de la fonction des cellules progénitrices circulantes impliquées dans la réparation endothéliale (van Ierssel et al., 2013). Les résultats suggèrent que les marqueurs cellulaires de la réparation endothéliale pourraient être utiles dans l'évaluation et l'évolution du dysfonctionnement des organes et même dans l'issue des épisodes de sepsis. Les CE libèrent également des microparticules protectrices contre l'hyporeactivité vasomotrice, ce qui explique l'hypotension chez les patients présentant un choc septique (Mostefai et al., 2008).

Dans l'ensemble, un grand nombre de données suggèrent que les CE sont les principaux régulateurs du dysfonctionnement physiologique et immunologique pendant et après le sepsis, et que la modulation des CE est peut-être bénéfique pour améliorer la survie à long terme des humains atteints de sepsis.

- Neutrophiles

Les neutrophiles sont le type de cellule innée le plus répandu de la fonction innée, essentiel au confinement et à l'éradication des microbes, et condition préalable à la survie à long terme du sepsis (Nathan, 2006). Ils constituent la majorité de la cellularité de la moelle osseuse et font parties des premières cellules à répondre aux sites d'infections microbiennes (Link, 2005). L'une des altérations immunitaires innées les plus prononcées dans le sepsis est un retard de l'apoptose des neutrophiles (Richard S. Hotchkiss & Nicholson, 2006), qui entraîne un dysfonctionnement continu des neutrophiles. Cet état retardé de l'apoptose des neutrophiles est encore aggravé par la libération de neutrophiles immatures de type bandelettes de la moelle osseuse qui présentent des déficits évidents en éclatement oxydatif (Delano, Thayer, et al., 2011), en modèles de migration cellulaire (Delano, Kelly-Scumpia, et al., 2011; Eash, Greenbaum, Gopalan, & Link, 2010), en capacité d'activation complémentaire et en éradication bactérienne (Grailer et al., 2014), qui se combinent et contribuent tous à un dysfonctionnement immunitaire et une inflammation persistants. Ces résultats, combinés à des déficits de signalisation du TLR (Lerman et al., 2014), à des réductions de chemotaxie induites par la chemokine (Alves-Filho et al., 2009), à une modification des voies de signalisation de l'apoptose et à une sénescence immunitaire des neutrophiles (Nacionales et al., 2014), entraînent une multitude de déficits fonctionnels qui durent longtemps après que les symptômes du sepsis ont disparu. De plus en plus de preuves scientifiques suggèrent que les neutrophiles peuvent fonctionner comme des APC dans un large éventail d'infections pathologiques et agir comme des crosstalkers entre les réponses innées et adaptatives par activation des cellules effectrices CD4+ et CD8+ (Davey et al., 2014; Delano et al., 2007). Plus important encore, de multiples études chez l'humain ont mis en cause l'ensemble complexe des dysfonctionnements persistants des neutrophiles dans le développement des infections nosocomiales (Morris et al., 2011).

En plus de la capacité d'éliminer les pathogènes par phagocytose, éclatement oxydatif et/ou dégranulation, il a récemment été démontré que les neutrophiles peuvent éradiquer un large éventail de microorganismes en formant des pièges extracellulaires de neutrophiles (PEN) (Brinkmann et al., 2004). Ce nouveau mécanisme implique la libération de protéines antimicrobiennes ancrées à un réseau chromatinique de neutrophiles activés. La libération de PEN fait partie intégrante de la pathogenèse de maladies comme le sepsis, l'athérosclérose et l'auto-immunité

(Sørensen & Borregaard, 2016; Warnatsch, Ioannou, Wang, & Papayannopoulos, 2015). L'ADN est le principal composant structurel des PEN. De plus, les protéines granuleuses et cytoplasmiques, y compris l'élastase neutrophile (NE), la myéloperoxydase (MPO), la cathepsine G, la protéinase 3 (PR3), la gélatinase, LL-37, la lactoferrine, la calprotectine ainsi que les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4, sont toutes intégrées au réseau de l'ADN comprenant le PEN. Les fibres d'ADN favorisent le confinement physique des microbes, tandis que les histones et les protéines granulaires confèrent une fonction antimicrobienne aux PENs. La production de PEN nécessite des interactions plaquettes-neutrophiles et peut être inhibée par une déplétion plaquettaire ou une perturbation de la liaison plaquettes-neutrophiles par l'intégrine. Libérées dans le système vasculaire pour piéger les bactéries de la circulation sanguine, les PENs empêchent la dissémination bactérienne (McDonald, Urrutia, Yipp, Jenne, & Kubes, 2012). Pendant le sepsis, la libération de PEN augmente la capture bactérienne de 4 fois dans les sinusoïdes du foie. De plus, la corrélation entre la présence de PEN dans le sang périphérique et le dysfonctionnement des organes a été évaluée chez 31 patients septiques. Des concentrations élevées de PEN ont été observées chez les patients atteints de sepsis, contrairement aux témoins en bonne santé, et des niveaux élevés de PEN ont été associés à la gravité du sepsis et au dysfonctionnement des organes (Czaikoski et al., 2016). Collectivement, ces connaissances fournissent une base à partir de laquelle explorer le potentiel de la thérapie immunomodulatrice pour exploiter les avantages de la formation de PEN dans les états d'infection bactérienne tout en minimisant les risques d'aggravation de la dysfonction des organes.

- Monocytes et macrophages

L'impact d'un épisode de sepsis sur les sous-populations de monocytes humains a longtemps fait l'objet au cours des cinquante dernières années d'études approfondies. Depuis des décennies, il est évident que la réduction de l'expression des cellules mononucléaires est clairement corrélée à la mortalité par sepsis humaine (Cheadle et al., 1989). De plus, la capacité réduite des monocytes sanguins des patients septiques à libérer sur le long terme des cytokines pro-inflammatoires après la première réponse forte à l'endotoxine (LPS) a été décrite comme une " tolérance aux endotoxines " alors que la stimulation de ceux-ci par du β-glucan entraine une meilleure réponse lors de la seconde réponse inflammatoire, ce qui a été suggéré pour faciliter de mauvais résultats à long terme du sepsis (Livingston, Appel, Wellhausen, Sonnenfeld, & Polk, 1988; Munoz et al., 1991). Bien que diverses voies de signalisation cellulaires mononucléaires complexes soient modifiées et contribuent à l'établissement d'une tolérance aux endotoxines, la principale implication sur les monocytes et, dans une moindre mesure, les macrophages, est la réduction de la présentation de l'antigène liée à une diminution de l'expression de la surface cellulaire HLA-DR (Döcke et al., 1997). En plus des

réductions claires et persistantes de l'expression de la surface cellulaire HLA-DR, les monocytes des patients septiques démontrent également une capacité réduite de sécréter les cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1, IL-6, et IL-12 responsable de la tempête cytokinique après une première stimulation au LPS mais une réponse accrue lors de la première stimulation au β-glucan. La capacité réduite des monocytes à sécréter des cytokines pro-inflammatoires suggère que la signalisation intracellulaire s'est déplacée vers la production de médiateurs anti-inflammatoires qui sont associés aux infections acquises, continues et secondaires à l'hôpital qui, en fin de compte, augmentent la mortalité associée au sepsis au long terme.

Actuellement, de nombreux chercheurs s'entendent pour dire que la réduction de l'expression du HLA-DR des monocytes est un marqueur de substitution de l' "anergie" des monocytes, du développement d'infections continues et de la mort du patient (Cazalis et al., 2013 ; Cheron et al., 2010 ; Landelle et al., 2010). En plus d'une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, plusieurs rapports associent une faible expression de HLA-DR monocytaire à une réduction de la prolifération des lymphocytes spécifiques des antigènes (Monneret, Venet, Pachot, & Lepape, 2008 ; Venet et al., 2006). Ces résultats suggèrent que l'anergie monocytaire induite par le sepsis et la suppression immunitaire contribuent séparément au risque accru de complications et d'effets indésirables du sepsis. Bien que les mécanismes responsables de la tolérance aux monocytes stimulés au LPS ne soient pas encore clairement définis, la reprogrammation épigénétique des monocytes induite par le sepsis pourrait jouer un rôle central dans l'établissement de la tolérance aux LPS, l'anergie myéloïde et le phénotype global des monocytes immunodépresseurs (Carson IV, Cavassani, Dou, & Kunkel, 2011). L'analyse de l'ARNm monocytaire humain montre clairement des niveaux accrus de gènes cytokines inhibiteurs et des niveaux réduits de gènes chemokines pro-inflammatoires (Ishii et al., 2009). Des rapports récents sur les monocytes humains fournissent un argument substantiel et convaincant en faveur de l'impact important de la reprogrammation épigénétique sur l'établissement de l'anergie monocytaire, mais l'impact fonctionnel réel de ces altérations épigénétiques sur les résultats à long terme du sepsis humain reste inconnu (Saeed et al., 2014).

- Cellules tueuses naturelles (NK)

Historiquement, les cellules NK étaient considérées comme des cellules tueuses de cellules hôtes. Cependant, heureusement, le domaine de l'immunité innée a progressé et nous savons maintenant clairement que les cellules NK agissent comme régulateurs des fonctions immunitaires complexes. Les cellules NK peuvent être classées en différents sous-groupes basés sur l'expression relative des molécules de surface cellulaire CD16 et CD56 (Poli et al., 2009). Des données chez l'homme indiquent que les sous-groupes de cellules NK de type CD56hi et CD56low sont modifiés de façon significative pendant les épisodes de sepsis. Ces modifications ont récemment été associées dans plusieurs rapports à une

augmentation de la létalité dans le sepsis humain (Halstead, Carcillo, Schilling, Greiner, & Whiteside, 2013 ; Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012). De plus, la fonction cytotoxique des cellules NK dans le sepsis humain est fortement diminuée (Chiche et al., 2012). De la même manière que pour la tolérance aux LPS des monocytes, la production de IFNγ des cellules NK en réponse aux agonistes TLR est également diminuée. Ces données indiquent que la tolérance aux cellules NK pourrait être responsable de la réactivation de virus latents comme le CMV, qui est fréquemment rencontré dans les populations des unités de soins intensifs et, surtout, pourrait servir de cible future pour une intervention thérapeutique (Limaye et al., 2008). Malgré le faible nombre de données publiées, les cellules NK sont des acteurs majeurs de l'issue du sepsis via la modulation de la production d'IFNγ (Giamarellos-Bourboulis, 2014). Les résultats contradictoires des études cliniques peuvent s'expliquer par la variabilité du temps d'échantillonnage et l'hétérogénéité apparente des patients. L'activation des cellules NK protège contre la pneumonie par la production excessive d'IFNγ qui inhibe la croissance bactérienne et a un impact majeur sur le résultat du sepsis (Broquet et al., 2014).

- Cellules dendritiques (CD)

Les CD sont traditionnellement divisées en 2 sous-populations les CD conventionnels (CDc) et les CD plasmacytoïdes (CDp). Les CDc sont similaires aux monocytes et sécrètent de l'IL-12, tandis que les CDp sont similaires aux plasmocytes et sécrètent de grandes quantités de l'IFNα. Ces derniers sont particulièrement intéressants en raison de leur apoptose accrue pendant un sepsis (Richard S. Hotchkiss et al., 2002) et chez les patients qui ont développé une infection nosocomiale (D. Grimaldi et al., 2011). Bien que les CD aient des fonctions immunitaires variables par rapport aux monocytes, comme les monocytes, les CD présentent également une expression HLA-DR réduite et produisent des quantités accrues d'IL-10 (Pastille et al., 2011) immunosuppresseur. De plus, la co-culture de CD avec des effecteurs T induit l'anergie des lymphocytes T et la prolifération de Treg, qui sont en corrélation avec le dysfonctionnement immunitaire induit par le sepsis. Quelques études récentes ont démontré que la prévention de l'apoptose CD induite par le sepsis ou l'augmentation de la fonction CD améliore la survie à long terme du sepsis (Efron et al., 2004 ; Scumpia et al., 2005). Plusieurs rapports démontrent que la suppression immunitaire peut être améliorée par un traitement en continu avec le facteur de croissance FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L). Chez des patients brûlés, les modèles thérapeutiques FLT3L améliorent la sécrétion de cytokines dans les CD (IL-12, IL-15 et IFNγ) et augmentent la fonction des lymphocytes T CD4+, NK et neutrophiles (Toliver-Kinsky, Lin, Herndon, & Sherwood, 2003). D'autres recherches indiquent que les gains associés aux CD dans la survie au sepsis se produisent par les voies de signalisation TLR, l'augmentation de l'antigène de classe II du CMH et l'expression des molécules co-stimulatrices CD80

et CD86 (Benjamim et al., 2005). Ces observations ont amené les chercheurs et les cliniciens à supposer que l'amélioration du nombre et de la fonction des CD pourrait constituer un objectif de rendement élevé pour les interventions thérapeutiques futures dans le traitement du sepsis (Efron et al., 2004 ; Scumpia et al., 2005).

- Cellules suppressives myéloïdes (MDSC) et myélopoïèse

Les MDSC sont une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures qui se développent considérablement en cas de sepsis, entravent les réponses immunitaires et les voies de signalisation qui sont médiées par les voies TLR (Delano et al., 2007 ; Ochoa et al., 2001). Les MDSC associées au sepsis sont phénotypiquement similaires aux MDSC décrites dans les états de cancer avancé (Delano et al., 2007 ; Gabrilovich, Ostrand-Rosenberg, & Bronte, 2012). Bien qu'il ait été démontré que les MDSC inhibent la fonction des cellules CD8+, l'impact réel et fonctionnel des MDSC dans le sepsis est encore incertain. Un résumé de la littérature actuelle suggère un rôle bénéfique centré sur la reconstitution de la fonction cellulaire innée et la surveillance immunitaire par granulopoïèse d'urgence (Delano, Kelly-Scumpia, et al., 2011). Avant l'expansion clonale des MDSC, il existe une fenêtre de susceptibilité aux infections secondaires et à la mortalité subséquente qui est associée à une réduction du nombre et de la fonction des cellules immunitaires innées dans le sang et les tissus (Delano, Thayer, et al., 2011). L'expansion importante des MDSC par granulopoïèse améliorée confère une immunité durable aux infections secondaires et nosocomiales en cas de sepsis (Cuenca et al., 2011). En raison de la difficulté inhérente au phénotypage immunitaire des cellules myéloïdes immatures entre les souris et les humains, très peu d'études cliniques ont examiné de près le rôle des MDSC dans le sepsis humain (Makarenkova, Bansal, Matta, Perez, & Ochoa, 2006). Néanmoins, on s'intéresse de plus en plus à la myélopoïèse, à l'expansion MDSC, à la granulopoïèse d'urgence et à la production et au fonctionnement des cellules souches hématopoïétiques (Delano et al., 2007 ; Delano, Thayer, et al., 2011 ; Kelly-Scumpia et al., 2010 ; Scumpia et al., 2010). En raison de l'importance de régénérer efficacement les neutrophiles, les monocytes et les CD fonctionnels, il n'est pas surprenant que les MDSCs se développent pour répondre au besoin continu de cellules immunitaires innées fonctionnelles.

Étant donné qu'il faut de cinq à sept jours à la moelle osseuse (BM) pour produire un neutrophile fonctionnel, il faut un bassin immature expansif (~18 x 10^11) de précurseurs de la lignée myéloïde dans la BM et les organes lymphoïdes secondaires (Cartwrigth, Athens, & Wintrobe, 1964) pour maintenir une cohorte fonctionnelle de cellules immunitaires innées. Chez l'homme, environ 16 x 10^10 neutrophiles sont produits quotidiennement, qui peuvent être rapidement multipliés par 5 à 10 en réponse à des envahisseurs microbiens étrangers et à des cas

pathologiques déclarés d'infection. Des travaux ont clairement démontré que l'expansion myéloïde impliquant des cellules souches hématopoïétiques (CSH) se produit par des mécanismes dépendants de c-KIT-, IFN- (IFN-I) de type I et CXCL10 qui impliquent des cellules B sécrétant IFN-I (Kelly-Scumpia et al., 2010 ; Scumpia et al., 2010). De plus, une altération de la prolifération, du développement et de la fonction des CSH dans les modèles de transplantation de BM humaine est clairement associée à une augmentation de la mortalité due aux infections secondaires, chroniques et nosocomiales (McCabe et al., 2015). Les humains dont la capacité de granulopoïèse est réduite souffrent sans aucun doute d'infections plus fréquentes, plus graves et plus anormales, ce qui démontre l'exigence essentielle d'une production efficace de neutrophiles. Récemment, il a été démontré que les patients atteints de sepsis présentaient une augmentation persistante des MDSC, une immunosuppression fonctionnelle et des effets indésirables, notamment une augmentation des infections nosocomiales, des séjours prolongés en unité de soins intensifs et un mauvais état fonctionnel au repos (Mathias et al., 2017). Inversement, une prolifération excessive de MDSC peut faciliter un syndrome physiologique d'inflammation persistante, comme le syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte (SDRA) ou l'immunosuppression inflammatoire persistante et le syndrome du catabolisme (SCI), ce qui fait que les patients septiques ont un mauvais résultat (Gentile et al., 2012). Des travaux récents de Terashima et de ses coauteurs ont démontré que l'inflammation aiguë entraîne la réduction des lymphocytes périphériques et des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) dans la moelle osseuse, ce qui est également associé à une diminution spectaculaire du nombre d'ostéoblastes. De plus, la production d'IL-7 spécifique des ostéoblastes pendant la myélopoïèse s'est révélée essentielle à la régulation de la lymphopoïèse pendant l'inflammation systémique et pourrait servir de cible pour une meilleure production de lymphocytes (Terashima et al., 2016). Les contributions spécifiques de la lymphopoïèse, de la myélopoïèse et des MDSC à la guérison du sepsis par rapport à l'inflammation persistante et au catabolisme demeurent mal comprises. Cependant, de nouvelles connaissances sur ces processus et leur rôle dans la résolution et le rétablissement du sepsis présenteront, espérons-le, de nouvelles cibles pour la thérapie immunomodulatrice afin d'améliorer les résultats lors du sepsis.

- **Immunité adaptative**

- Apoptose lymphoïde et suppression immunitaire

Chez la majorité des patients septiques, les lymphocytes circulants et les cellules épithéliales gastro-intestinales subissent une apoptose importante, tandis que l'apoptose et la nécrose du cœur, des reins et des poumons ne sont pas apparentes (Richard S. Hotchkiss, Coopersmith, & Karl, 2005). L'apoptose des lymphocytes est

désormais reconnue comme une étape importante dans la pathogenèse du sepsis et contribue à l'immunosuppression septique (Lang & Matute-Bello, 2009). L'apoptose des lymphocytes a été décrite chez des patients atteints de sepsis et dans des modèles animaux de sepsis (Richard S. Hotchkiss, Osmon, et al., 2005 ; Richard S. Hotchkiss et al., 1997). Il est important de noter que l'apoptose lymphocytaire s'est produite par les voies intrinsèque (Fas, FasL) et extrinsèque (TNF) (Richard S. Hotchkiss, Osmon, et al., 2005). Bien que les facteurs déterminants de ce phénomène ne soient pas encore clairs, des données récentes suggèrent que la libération d'histones extracellulaires pendant le sepsis pourrait entraîner l'apoptose des lymphocytes (Grailer, Fattahi, Dick, Zetoune, & Ward, 2015 ; Liu et al., 2013). Le blocage thérapeutique de l'apoptose lymphocytaire et/ou la restauration de la fonction lymphocytaire ont généré des données précliniques prometteuses qui pourraient conduire à de nouveaux traitements après des épisodes de sepsis chez l'homme (Brahmamdam et al., 2010 ; Richard S. Hotchkiss, Coopersmith, et al., 2005 ; Unsinger et al., 2010).

- Cellules lymphocytes gamma delta T (Cellule γδ T)

Les lymphocytes Tγδ sont un petit sous-ensemble de lymphocytes T qui possèdent un récepteur de lymphocytes T (RCT) particulier à leur surface cellulaire. La majorité des lymphocytes T ont un RCT composé de deux chaînes glycoprotéiques α et β, tandis que les lymphocytes T γδ ont un RCT composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ. Ce groupe distinct et unique de lymphocytes T existe principalement à l'intérieur et autour de la muqueuse intestinale au sein d'une population de lymphocytes intra-épithéliaux (Holtmeier & Kabelitz, 2005). Bien que les antigènes auxquels répondent les lymphocytes T γδ ne soient encore pas encore très bien connus, on soupçonne que ces cellules reconnaissent les antigènes lipidiques des agents pathogènes présents sur les surfaces muqueuses de l'intestin (Andreu-Ballester et al., 2013). Lors de l'activation, les cellules T γδ libèrent l'IFNγ, IL-17 et d'autres chemokines inflammatoires. Chez les humains atteints de sepsis, le nombre de lymphocytes T en circulation est considérablement réduit, et ces réductions sont clairement en corrélation avec les taux les plus élevés de létalité du sepsis (David Grimaldi et al., 2014). La réduction observée des lymphocytes T γδ dans la muqueuse intestinale peuvent servir à potentialiser les types de bactéries intestinales typiquement non invasives pour qu'elles deviennent plus invasives et passent dans la circulation systémique de l'hôte, provoquant des infections pathologiques après des épisodes de sepsis (Tomasello & Bedoui, 2013). Chez les patients atteints de sepsis aiguë, les neutrophiles circulants présentent un phénotype semblable à celui des APC et traitent facilement les protéines solubles pour la présentation croisée des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD8+, à un moment où les lymphocytes T périphériques γδ sont fortement activés (Davey et al., 2014). Les auteurs concluent que les lymphocytes T non conventionnels sont

des cellules clés pour le contrôle des réponses innées des neutrophiles à une vaste gamme d'agents pathogènes. Ces cellules peuvent donc servir de cibles thérapeutiques pour l'amélioration de la réponse du système immunitaire. En outre, certains chercheurs ont également suggéré qu'il existe un potentiel thérapeutique énorme pour le sepsis via le ciblage cellulaire NKT (Szabo, Anantha, Shaler, McCormick, & Mansour Haeryfar, 2015).

- Sous-populations de lymphocytes TH

Les cellules auxiliaires T (cellules Th) aident d'autres types de cellules pour leur différenciation ou leur activation comme les cellules B, les cellules T cytotoxiques et les monocytes par des processus immunologiques. Lorsqu'elles sont confrontées aux antigènes peptidiques des molécules de CMH de classe II exprimées sur les APC, les cellules CD4+ sont rapidement activées, prolifèrent rapidement et sécrètent efficacement des cytokines qui régulent les réponses adaptatives et innées. Une fois activées, les cellules CD4+ ont la capacité de se différencier en l'un des sous-ensembles de lymphocytes T, dont Th1, Th2, Th3, Th17, Th22, Th9 ou TFH, qui produisent des cytokines différentes et orientent la réponse immunitaire (Gutcher & Becher, 2007). Bien que de nombreux rapports relatent les effets du sepsis sur les sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ circulants et périphériques (Venet et al., 2008), la section qui suit n'aborde que les recherches les plus pertinentes et d'intérêt thérapeutique.

Comme dans le cas des neutrophiles et des monocytes, l'un des défauts les plus délétères des lymphocytes T induits par le sepsis est le développement de l'apoptose qui décime les populations CD4+ (Richard S. Hotchkiss et al., 2001). Chez les patients qui meurent d'une infection (sepsis), l'apoptose des lymphocytes (en particulier des CD4+) est beaucoup plus importante que chez les survivants. Parmi les cellules CD4+ qui parviennent à persister, de multiples études démontrent que la production de cytokines associées aux lymphocytes Th1 est réduite pendant et longtemps après la disparition du sepsis (O'Sullivan et al., 1995). Des réductions marquées des facteurs de transcription T-bet et GATA3, qui modulent respectivement la réponse Th1 et Th2, appuient l'idée que les sous-ensembles CD4+ sont supprimés pendant un sepsis (Pachot et al., 2005). Il existe divers facteurs qui régulent et influencent la différenciation de la sous-population CD4+ Th, y compris la méthylation des histones et le remodelage de la chromatine, qui, ensemble, sont supposés supprimer les fonctions des cellules T CD4+ Th1 et Th2 (Romani, 2011). Cependant, l'impact immunitaire dans le sepsis concernent les autres sous-ensembles Th également. En particulier la production de cytokines par les Th17 est réduite en cas de sepsis et a probablement un impact négatif sur la

mortalité à long terme (Wu et al., 2013). Étant donné le rôle fondamental des lymphocytes Th17 dans l'éradication des infections fongiques pathologiques, la réduction de la production de cytokines Th17 dans le sepsis est probablement responsable de la susceptibilité accrue aux infections fongiques fréquemment observée dans les populations gravement malades (Smeekens et al., 2013). Les cellules CD4+ et CD8+ circulantes des patients atteints de Candidémie présentent un phénotype immunitaire compatible avec la suppression immunitaire, l'épuisement des cellules T et la régulation négative des molécules co-stimulantes positives (Spec et al., 2016). De plus, il a été démontré que le traitement par l'IL-7 augmente la réactivité des cellules Th17 et réduit la mortalité due aux infections fongiques secondaires, faisant de l'IL-7 un agent thérapeutique potentiel (Unsinger et al., 2010). Ces résultats peuvent aider à expliquer pourquoi les patients atteints de sepsis fongique présentent un taux de mortalité élevé malgré un traitement antifongique approprié.

- Lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Les cellules Tregs sont des régulateurs clé de l'immunité adaptative qui suppriment les réponses d'autres sous-ensembles de lymphocytes T effecteurs, aidant à maintenir l'autotolérance et inhibant les réactions auto-immunes. Dans les cas de sepsis, de maladie grave et d'inflammation, les cellules Treg potentialisent la suppression des lymphocytes T effecteurs délétères (Teff), ce qui prolonge la récupération et peut entraîner des complications accrues. L'augmentation des Treg a été décrite peu après les épisodes de sepsis et demeure élevé chez les patients qui sont décédés d'un sepsis pendant leur hospitalisation. D'autres auteurs rapportent que l'augmentation du nombre de Treg est due à la perte des lymphocytes Th effecteurs due à l'apoptose plutôt qu'à une augmentation absolue du nombre de Treg (Venet et al., 2009). Cette observation suggère pour beaucoup que les lymphocytes Tregs sont résistants à l'apoptose induite par le sepsis. De plus, les protéines et les histones de choc thermique qui induisent des changements épigénétiques des cellules mononucléaires jouent également un rôle d'inducteurs de Tregs dans le sepsis (Zanin-Zhorov et al., 2006). Des rapports dans le modèle murin démontrent que les cellules Tregs sont nuisibles à la prolifération de Teff et à la fonction immunitaire (Scumpia et al., 2006). Cet effet est amélioré par l'administration de siRNAs thérapeutiques qui inhibent la différenciation du Treg (Venet et al., 2009). Dans d'autres études, des anticorps inhibiteurs des protéines liées aux récepteurs du TNF (GITR) induits par les glucocorticoïdes ont été utilisés pour bloquer la fonction Treg, ce qui a amélioré la fonction immunitaire et la destruction microbienne (Scumpia et al., 2007). En conclusion, il existe une théorie selon laquelle dans le cas du sepsis, les cellules Tregs résistent à l'apoptose, augmentent la dérégulation cellulaire des cellules Teff et contribuent au

développement de l'infection. Les cellules Treg peuvent donc servir de cibles pour la modulation immunitaire.

- Lymphocytes B

Les lymphocytes B constituent une population très diversifiée de cellules immunitaires aux attributs fonctionnels et phénotypiques variés. Historiquement, la fonction des lymphocytes B était la production d'anticorps (Mauri & Bosma, 2012). Inversement, un corpus de connaissances en croissance rapide et la collecte de rapports récents démontrent que les lymphocytes B jouent un rôle beaucoup plus crucial dans la biologie immunitaire du sepsis qu'on ne le pensait auparavant. Il est clair que les humains atteints d'un choc septique ont une réduction globale du nombre de lymphocytes B, mais le déficit le plus important en nombre de lymphocytes B se situe dans les cellules de type CD5+ B1a, qui est corrélée à la survie après des épisodes de sepsis (Monserrat et al., 2013). Dans les modèles murins de sepsis humaine, les cellules B sont nécessaires pour améliorer la production de cytokines, réduire la charge bactérienne et améliorer la survie par la signalisation de l'interféron de type I (Kelly-Scumpia et al., 2011). Une étude récente a identifié une population de lymphocytes B activateurs de la réponse innée (IRA), qui est phénotypiquement et fonctionnellement distincte des cellules B1a et dépend des PRRs, pour produire du granulocytes-macrophage-CSF (GM-CSF). L'inhibition des cellules B de l'IRA entrave l'éradication bactérienne, renforce une tempête de cytokines et perpétue les symptômes du choc septique. Ces récentes clarifications positionnent les cellules IRA B comme les gardiennes immunologiques de l'élimination des infections bactériennes et reconnaissent simultanément les cellules IRA B comme une nouvelle cible thérapeutique pour améliorer la survie dans le sepsis humain (Rauch et al., 2012). Enfin, la production d'IL-3 par les cellules B de l'IRA B augmente considérablement l'inflammation associée au sepsis, induire la production myéloïde de cellules mononucléaires Ly-6C high et potentialise la production de cytokines, tandis que des taux plasmatiques élevés d'IL-3 sont en corrélation avec une mortalité accrue par sepsis humain (Weber et al., 2015). Les cellules B stimulées ex vivo chez les patients vieillissants et septiques présentent des réductions significatives de la production d'IgM surnageantes (Suzuki et al., 2016). Cette découverte est cliniquement pertinente et intéressante et peut expliquer pourquoi les patients âgés dont la production d'IgM a diminué sont plus sensibles aux bactéries gram-négatives et aux infections fongiques. La réduction des lymphocytes B immunocompétents peut être liée à une augmentation de l'infection secondaire après un sepsis, en particulier chez les personnes âgées. Tout bien considéré, les progrès récents et considérables dans notre compréhension de la biologie des lymphocytes B nous ont permis de mieux comprendre le rôle des lymphocytes B dans la modulation immunitaire, la myélopoïèse d'urgence et la

production d'IL-3, qui constitue également un nouveau domaine thérapeutique potentiel dans le sepsis (R. S. Hotchkiss & Sherwood, 2015 ; Gustave et al., 2018).

F) Thérapies immunomodulatrices en cas de sepsis

- **Le Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) et le Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)**

Le facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF) est une glycoprotéine qui stimule la production de cellules souches, de progéniteurs et de granulocytes de toutes les plages de maturité (Lieschke et al., 1994). Le G-CSF est très efficace pour réduire l'incidence de sepsis chez les patients présentant un faible nombre absolu de neutrophiles, tels que ceux qui subissent une greffe de BM, une chimiothérapie anticancéreuse ou une radiation auto-immune (Petit, Ponomaryov, Zipori, & Tsvee, 2002). Deux essais humains contrôlés randomisés avec du G-CSF recombinant ont été menés dans le but de renforcer la production, la maturité et l'activation des neutrophiles. Les cliniciens et les chercheurs ont également émis l'hypothèse selon laquelle le G-CSF améliorerait la fonction des granulocytes et l'élimination des microbes dans de telles circonstances. Bien qu'une augmentation du nombre de leucocytes sanguins ait été réalisée, il n'y avait pas d'amélioration de la mortalité des patients à 28 jours (Nelson et al., 2000 ; Root et al., 2003). Bien que les conclusions initiales de ces deux études cliniques aient été décourageantes, le fait demeure que le postulat de ce rapport est que la majeure partie de la mortalité induite par le sepsis se produit dans un processus prolongé au-delà de 90 jours. On peut donc se demander si un temps d'étude ou de traitement plus long aurait des conséquences sur les résultats de l'enquête. Cependant, à partir de ce moment, l'impact du G-CSF sur la mortalité au-delà de 28 jours est inconnu. Compte tenu des modifications constantes et continues observées dans la production de granulocytes, la myélopoïèse et la fonction des neutrophiles, en particulier chez les patients présentant une comorbidité telle que le diabète et la fragilité physiologique, une administration prolongée de G-CSF peut être efficace pour améliorer la surveillance immunitaire, l'éradication de l'infection, la régénération tissulaire et la survie au sepsis dans les essais cliniques futurs.

Le GM-CSF est une autre cytokine qui améliore la production de neutrophiles, de monocytes et de macrophages par les cellules souches et les progéniteurs (Francisco-Cruz et al., 2014). Au cours de la phase immunosuppressive du sepsis, les patients dépendant du respirateur et traités avec le GM-CSF recombinant avaien besoin det moins de jours de respirateur et en réanimation (Meisel et al., 2009 ; Paine et al., 2012). En outre, le traitement par recombinaison de GM-CSF dans des populations pédiatriques immunodéprimées présentant un sepsis grave a permis de rétablir la production de TNF dans les lymphocytes et de réduire considérablement les infections nosocomiales (Hall et al., 2011). Une méta-analyse de plus de 12

études cliniques portant sur le G-CSF ou le GM-CSF a démontré que le traitement par GM-CSF permettait de réduire considérablement le taux de complications infectieuses (Bo, Wang, Zhu, Li, & Deng, 2011). Bien que 70 à 80% des patients qui succombent à un sepsis soient porteurs d'infections persistantes, chroniques, persistantes ou secondaires, le GM-CSF et / ou le G-CSF en association avec d'autres agents immunomodulateurs peut s'avérer inestimable pour améliorer l'éradication de l'infection pendant et après l'infection et améliorer la survie à long terme après l'infection (Mathias, Szpila, Moore, Efron, & Moldawer, 2015 ; Nelson et al., 2000).

- **Interféron gamma (IFNγ)**

L'interféron gamma (IFNγ) est l'unique membre de la famille de l'interféron de type II. Une production et une signalisation adéquates d'IFNγ sont essentielles pour une fonction immunitaire appropriée contre les envahisseurs viraux, bactériens et à protozoaires. De plus, l'IFNγ est un inducteur central de l'activation des macrophages, induisant une stimulation de l'expression du CMH de classe I et de classe 2 (Döcke et al., 1997). Lorsqu'ils sont traités avec de l'IFNγ recombinant, les patients présentant un sepsis sévère (definition sepsis-2) et une diminution des taux de HLA-ClII monocyte montrent une inversion du dysfonctionnement monocyte induit par le sepsis et une survie globale améliorée (Nalos et al., 2012). Bien que la majorité des essais thérapeutiques interventionnels portant sur l'IFNγ aient été menés dans des cohortes de traumatismes graves, le plus important de ces rapports a clairement démontré une diminution de la mortalité liée à l'infection chez les patients traités à l'IFNγ (Dries et al., 1994). En outre, une nouvelle étude portant sur des patients traumatisés graves a révélé que 42 des 63 gènes identifiés comme étant différentiellement exprimés chez des patients présentant des formes simples ou compliqués étaient spécifiquement associés à la signalisation par interféron. Les chercheurs ont découvert que les gènes associés à la voie de signalisation de l'IFN étaient inhibés chez les patients traumatisés dont l'issue était complexe (Cuenca et al., 2013; Xiao et al., 2011), ce qui impliquait que cet ensemble de gènes pouvait être utile pour identifier les patients présentant un risque de complications après un traumatisme. De plus, ces patients susceptibles de développer des complications peuvent préférentiellement répondre aux thérapies utilisant les agonistes de l'IL-7, de l'IL-15, de l'IFNγ et du GITR. L'IFNγ est très prometteur s'il cible les populations de patients pouvant en bénéficier, telles que les personnes qui manifestent ou risquent de présenter une immunodépression, une diminution de l'expression de HLA-DR monocyte, un dysfonctionnement du système immunitaire adaptatif ou une inflammation chronique pendant les séjours prolongés à l'hôpital. Dans un rapport récent, le traitement par IFNγ recombinant a permis de rétablir partiellement les anomalies métaboliques du système immunitaire associées à la paralysie

immunitaire chez l'homme après un sepsis, ce qui suggère que le traitement par IFNγ après un sepsis pourrait être bénéfique pour une multitude de fonctions immunitaires cellulaires (Cheng et al., 2016). Bien que l'IFNγ offre des perspectives prometteuses en tant que thérapie immunomodulatrice potentielle compte tenu de sa capacité à rajeunir la fonction des monocytes / macrophages et une immunité adaptative, l'IFNγ pourrait être plus efficace s'il était administré dans une approche échelonnée dans le temps, comme GM-CSF et G-CSF ou même les inhibiteurs de l'IL-7 et / ou de la PD-1 qui renforcent la fonction immunitaire spécifique, réduisent les infections secondaires et nosocomiales et améliorent la survie à long terme.

- **Protéine-1 et ligand de mort cellulaire programmée (PD-1 et PD-L1)**

Les progrès constants de la biologie du cancer ont généré une nouvelle classe de médicaments inhibant la mort cellulaire programmée. La protéine-1 (PD-1) est une protéine qui, sous l'homéostasie, génère un signal inhibiteur qui réduit la prolifération et l'accumulation de cellules T CD8 + dans des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques. PD-1 est exprimé sur la plupart des lymphocytes T et B et des cellules myéloïdes. Le ligand de PD-1 (PD-L1) est exprimé de manière omniprésente sur les cellules épithéliales et endothéliales, les monocytes, les macrophages et les DC (Chen & Flies, 2013). Considérant que la PD-1 est régulée positivement sur les cellules CD4 + et CD8 + au cours d'infections virales et de cancers, elle est souvent associée au phénomène d '« épuisement des cellules T », qui résulterait de périodes prolongées d'exposition à des auto-antigènes (Day et al., 2006). Les traitements anti-PD-1 et anti-PD-L1 ont montré des résultats prometteurs dans des essais sur des cancers et des infections virales chez l'homme. Par conséquent, les chercheurs ont postulé que le traitement anti-PD-1 et anti-PD-L1 pourrait également avoir des résultats bénéfiques similaires en réduisant le dysfonctionnement immunitaire induit par le sepsis qui entraîne des complications infectieuses continues (Topalian et al., 2012). Les patients en choc septique présentent des taux accrus de PD-1 et de PD-L1 sur leurs types de cellules monocytes et lymphocytes T (Y. Zhang et al., 2011). Des études récentes démontrent que la régulation à la hausse de la PD-L1 des granulocytes conduit à une potentialisation de l'apoptose des lymphocytes par inhibition de contact (J. F. Wang et al., 2015). De plus, dans des modèles animaux de sepsis expérimentaux cliniquement pertinents, l'inhibition des voies de signalisation de PD-1 et de PD-L1 a amélioré la survie et réduit le nombre d'infections fongiques (K. C. Chang et al., 2013). Compte tenu de l'impact bénéfique sur les stratégies d'immunité adaptative et d'éradication tumorale, il est logique que PD-1 et PD-L1 puissent simultanément servir de biomarqueurs de la suppression immunitaire initiée par le sepsis, ainsi que de cibles thérapeutiques potentielles visant à inverser le dysfonctionnement immunitaire adaptatif et à améliorer le traitement à long terme survie.

- **IL-3 humaine, IL-7, IL-15 humaine recombinante**

Compte tenu de l'inhubition des lymphocytes est bien documentée et significative en cas de sepsis, l'administration d'IL-7 a été suggérée comme stratégie de traitement possible. L'IL-7 est une cytokine hématopoïétique produite par les cellules stromales BM et est une condition préalable à la production, à la maturation, à l'homéostasie et au maintien des cellules B et T (MacKall, Fry, & Gress, 2011). L'IL-7 est une thérapie attrayante en raison de sa capacité à réguler positivement la protéine anti-apoptotique BCL-2, qui provoque une augmentation du nombre de cellules CD4 + et CD8 + dans le sang périphérique. L'IL-7 augmente également la diversité du TCR, qui est perdue chez les patients septiques et est associée à une augmentation du développement d'infections nosocomiales et de complications hospitalières (Perales et al., 2012 ; Unsinger et al., 2010). De faibles doses d'IL-7 humaine recombinante activent préférentiellement les Teff chez les patients présentant un sepsis (Demaret et al., 2015). Des preuves récentes indiquent que l'IL-7 peut améliorer l'expression des PD-1 des lymphocytes, mais l'expansion et la survie des lymphocytes T périphériques induites par les cytokines restent intactes (Kinter et al., 2008). Cependant, quand IL-7 était administré à des patients infectés par le VIH, l'expression de PD-1 dans les lymphocytes était diminuée (Lévy et al., 2012). Bien que l'IL-7 puisse fonctionner en synergie avec d'autres traitements ciblant PD-1 ou PD-L1 pour améliorer certains aspects de la perte de la fonction des lymphocytes T en cas de sepsis, la capacité de la PD-1 ou de la PD-L1 de réduire les infections nosocomiales ou d'améliorer la survie dans le sepsis humain est actuellement inconnue. De nouvelles preuves suggèrent que le sepsis réduit le nombre d'ostéoblastes osseux, ce qui induit une lymphopénie par une régulation négative de l'IL-7, démontrant une interaction réciproque entre les systèmes immunitaire et osseux et identifiant les cellules osseuses comme cibles thérapeutiques potentielles du sepsis (Terashima et al., 2016).

Bien qu'il en soit encore aux phases scientifiques et expérimentales précliniques, il convient de mentionner l'IL-3 et l'IL-15 en tant que traitements potentiels du sepsis qui ont suscité une attention considérable. Considérant le rôle central de l'IL-15 dans le développement et l'activation des cellules T, NK et NKT et des neutrophiles effecteurs et mémoriels, elle est devenue un candidat thérapeutique prometteur pour de futurs essais sur le sepsis (Pelletier, Ratthé, & Girard, 2002). Dans les modèles murins de sepsis expérimentaux, le traitement à l'IL-15 diminuait le dysfonctionnement immunitaire global et réduisait la mortalité (Inoue et al., 2010). L'impact synergique de l'IL-3 sur la maturation et le développement des cellules souches et des progéniteurs ainsi que sur l'IL-7 fait de l'IL-3 un traitement attrayant pour renforcer l'impact potentiel de l'IL-7 thérapie (R. S. Hotchkiss & Sherwood, 2015 ; Weber et al., 2015). Cependant, il existe très peu de preuves relatives à

l'impact de l'IL-3 ou de l'IL-15 dans les états de sepsis humains et tout discours ultérieur est purement spéculatif.

- **Modulation du nerf vague**

Un nombre croissant de preuves au cours des deux dernières décennies a révélé que la production et la libération systémiques de cytokines sont contrôlées par le dixième nerf crânien (nerf vague). Le laboratoire Tracey a dirigé les recherches scientifiques qui ont permis d'élucider le bras efférent du réflexe inflammatoire (Tracey, 2002, 2007) comme voie anti-inflammatoire cholinergique (Borovikova et al., 2000). De nombreuses preuves expérimentales démontrent que l'activation du nerf vague est réalisée via une signalisation anti-inflammatoire cholinergique via des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine [alpha] 7 (7nAChR) exprimés sur des cellules productrices de cytokines non neuronales. Par conséquent, les agonistes des récepteurs 7nAChR inhibent la libération de cytokines associées au sepsis et protègent les animaux dans des modèles expérimentaux de sepsis et dans divers autres modèles expérimentaux inflammatoires (Hong Wang et al., 2004). La stimulation du nerf vague a un effet anti-inflammatoire en cas de sepsis et régule négativement la production de cytokines pro-inflammatoires en cas de sepsis, diminuant les niveaux de protéines plasmatiques du groupe de groupes à forte mobilité (HMGB1) et améliorant la survie dans les modèles de péritonite septique (Ulloa, 2005). La vagotomie chirurgicale augmente les taux plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires, les lésions tissulaires et la mortalité en cas de sepsis (Tracey, 2002). À l'inverse chez le rat les modèles de sepsis, la stimulation électrique du nerf vague atténue et prévient l'hypotension (X. M. Song et al., 2008), module la coagulation et l'activation de la fibrinolyse, qui atténuent tous les dysfonctionnements (van Westerloo et al., 2005). Par conséquent, le potentiel thérapeutique de la modulation de fibre efférente vagale pour traiter des troubles caractérisés par une dysrégulation des cytokines présente un grand intérêt (Rosas-Ballina & Tracey, 2009). Cependant, jusqu'à très récemment, il existait peu de données sur l'homme, indiquant que la modulation du nerf vague était réalisable, et encore moins bénéfique pour l'évolution des maladies inflammatoires (Kox & Pickkers, 2015). Des études cliniques récentes ont démontré que la stimulation du nerf vague par un minuscule dispositif bioélectronique implantable améliore considérablement les mesures de l'activité de la maladie chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, en réduisant spécifiquement la production de TNF (Koopman et al., 2016). Compte tenu des résultats positifs de la modulation du nerf vague dans des modèles expérimentaux de sepsis, ce dernier rapport offre un potentiel réel de la modulation systémique des cytokines à long terme.

Le potentiel récent de modulation de la réponse pro-inflammatoire été démontré par un rapport récent de Mucida et de ses coauteurs (Gabanyi et al., 2016). En incorporant des techniques d'imagerie de pointe et de profilage transcriptionnel, les auteurs démontrent que les macrophages de la zone de Lamina propria, résidant près du contenu des matières fécales, sont principalement pro-inflammatoires, prêts à générer des réponses inflammatoires robustes si la barrière épithéliale est endommagée. Inversement, les macrophages musculaires, situés plus en profondeur dans la paroi intestinale, sont principalement anti-inflammatoires et expriment un phénotype protecteur du tissu. Leur recherche du mécanisme de ce commutateur phénotypique a révélé que les signaux neuronaux adrénergiques régulent le commutateur protecteur du tissu par la signalisation de la noradrénaline via β2 AR (Gabanyi et al., 2016). C'est la première preuve directe d'un réflexe neural en boucle fermée qui régule l'immunité intestinale. En outre, si l'on prend en compte les informations les plus récentes sur la fonction de barrière intestinale, l'interaction hôte-pathogène et la contribution du microbiote au dysfonctionnement gastro-intestinal en cas de sepsis, la nouvelle découverte selon laquelle les réflexes neuronaux contrôlent le phénotype des macrophages ajoute de manière importante à la liste croissante de réflexes neuronaux impliqués dans la modulation de la fonction innée et adaptative cellulaire fonction immunitaire (Tracey, 2016).

- **Régulation métabolique de l'immunité**

Le système immunitaire protège contre les envahisseurs étrangers, maintient l'homéostasie tissulaire optimale et facilite la cicatrisation des plaies tout au long de la vie de l'organisme. Ces fonctions diverses et intégrales nécessitent un contrôle précis des voies cellulaires, métaboliques et bioénergétiques. Bien que ces premières observations aient été décrites au début du 20ème siècle (Kempner, 1939), des études plus récentes ont permis de mieux définir la base moléculaire de la manière dont les signaux extracellulaires contrôlent la capture, l'anabolisme et le catabolisme des nutriments dans les cellules immunitaires quiescentes, activées et inflammatoires. Ces rapports révèlent collectivement que le métabolisme oxydatif, la glycolyse et la glutaminolyse sont préférentiellement utilisés par les cellules immunitaires et décident de leur devenir et de leurs fonctions effectrices (Newsholme, Curi, Gordon, & Newsholme, 1986; Oren, Farnham, Saito, Milofsky, & Karnovsky, 1963). Depuis plus d'un siècle, nous savons que la propagation d'une réponse effectrice innée réussie dépend du métabolisme du glucose (Levene PA & Meyer GM, 1912). De plus, nous avons également compris depuis longtemps que la prolifération de cellules immunitaires adaptatives induite par les mitogènes repose sur l'utilisation de glutamine extracellulaire (Ardawi & Newsholme, 1982; E. A. Newsholme, Crabtree, & Ardawi, 1985).

Dans des conditions homéostatiques, les cellules immunitaires dépendent de la phosphorylation oxydative et de la β-oxydation en tant que sources d'énergie pour la production d'ATP afin de maintenir l'équilibre cellulaire (Vachharajani, Liu, & McCall, 2014). Cependant, après stimulation, les leucocytes modifient leur métabolisme vers la glycolyse aérobie procédé connu sous le nom d'effet Warburg (Figure 6)(Palsson-Mcdermott & O'Neill, 2013). Dans ce changement métabolique, l'énergie cellulaire est principalement produite par une augmentation de la glycolyse suivie d'une fermentation de l'acide lactique (production de lactate) dans le cytosol, plutôt que par un faible taux de glycolyse suivi d'une oxydation du pyruvate dans les mitochondries (Warburg, 1956 ; Girardot, Rimmelé, Monneret, Textoris, & Venet, 2018). Le facteur induit par l'hypoxie – 1a (HIF-1a) et la cible mécanique de la rapamycine (mTOR) sont les principaux moteurs de ce commutateur métabolique et, partant, du destin cellulaire (Lu, Forbes, & Verma, 2002; Q. Sun et al., 2011)(Figure 6). Lorsque les cellules immunitaires innées sont déficientes en HIFla spécifique de la myéloïde, les souris ne sont pas protégées contre le sepsis à S. aureus, ce qui indique que cette voie de HIFla et ce flux glycolytique font partie intégrante de la réponse immunitaire septique (Cheng et al., 2014). Cependant, le HIF-1a n'est pas le seul intermédiaire métabolique à l'origine des réponses immunitaires en cas de sepsis. Lors de l'exposition à des macrophages au LPS, il y a un passage de la phosphorylation oxydative à la glycolyse et au succinate et induisent la production d'IL-1β (Rodríguez-Prados et al., 2010 ; Tannahill et al., 2013). Le transporteur de glucose 1 (Glut1) induit une augmentation de la glycolyse facilitant le phénotype pro-inflammatoire des macrophages (Freemerman et al., 2014). Dans un rapport récent, des leucocytes humains rendus tolérants par exposition au LPS après isolement chez des patients atteints de sepsis et de paralysie immunitaire, un défaut métabolique généralisé a été montré au niveau de la glycolyse et du métabolisme oxydatif, qui a été restauré après le rétablissement du patient (Cheng et al., 2016). Par rapport aux valeurs initiales, l'expression des gènes sanguins chez les patients ayant développé une infection post-sepsis acquise en USI (unité de soin intensif) a révélé une expression réduite des gènes impliqués dans la gluconéogenèse et la glycolyse (Van Vught et al., 2016). De plus, la réponse génomique des patients présentant un sepsis était compatible avec une suppression immunitaire au début de l'infection secondaire en USI. Un autre rapport sur des patients atteints de sepsis a identifié des variants génétiques régulateurs impliquant des médiateurs clés de réseaux de gènes impliqués dans la réponse hypoxique et le passage à la glycolyse lors de sepsis, notamment HIF1α et mTOR, ainsi que des médiateurs de tolérance à l'endotoxine, d'activation des lymphocytes T et de défense virale (Davenport et al., 2016). Une meilleure compréhension des points de contrôle métaboliques qui contrôlent la fonction, la transition et la maturation des cellules immunitaires fournira de nouvelles informations sur la modulation de l'inflammation systémique, de l'immunité cellulaire et du rétablissement du patient atteint de sepsis. La prise de conscience que l'oncogenèse et les réponses immunitaires ont un mécanisme

commun de commutation métabolique après une stimulation indique des processus cellulaires fondamentaux pouvant servir de cibles thérapeutiques potentielles.

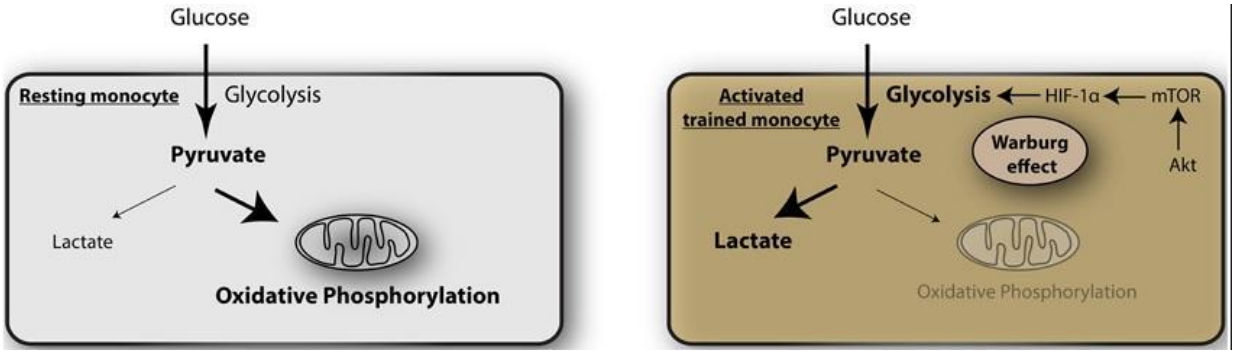


Figure 6 : Effet Warburg lors de la stimulation des monocytes
Dans les monocytes au repos, le métabolisme est prédominant par phosphorylation oxydative, fournissant une majorité de l'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie. Les monocytes activés pendant l'induction de l'immunité entraînée subissent un changement métabolique vers l'effet Warburg, médié par Akt-mTOR- HIF-1α d'après (Srivastava & Mannam, 2015)

Cette réponse immunitaire est aussi régulée par les variants géniques (SNPs) spécifiques à certaines populations dont 95% se situent dans des régions non codantes et peuvent faire varier le niveau d'expression des gènes impliqués dans cette réponse.

GÉNÉTIQUE HUMAINE

A) De l'étude d'association à l'annotation de SNP dans les régions non codantes

Des progrès considérables ont été réalisés au cours des dernières années dans la compréhension des maladies complexes en raison du développement de technologies de génotypage à haut débit. En utilisant des puces de génotypage qui contiennent des millions de polymorphismes mononucléotidiques (SNP), à l'échelle du génome, les études d'association (GWAS) ont identifié des SNP qui sont associés à de nombreuses maladies ou traits complexes (Buniello et al., 2019).

De telles études reposent sur des différences dans la fréquence allélique pour chacun des SNPs entre une population non malade (ou population de contrôle) et une population malade (ou population cas). À ce jour, ~84,7 millions de SNP ont été identifiés dans des populations humaines (Auton et al., 2015). Les puces de génotypages GWAS ne contiennent pas tous les SNP identifiés, elles ne contiennent que des SNP index qui représentent des SNP dans la base de données du même bloc de déséquilibre de liaison (LD). Cependant, on peut estimer qu'elles capturent la plupart des variations du génome humain.

Les SNP identifiés par les GWAS qui ont statistiquement un allèle surreprésenté dans les populations malades (ou cas) sont appelés SNP associés au risque et indiquent les régions génomiques contenant les possibles SNPs causaux. On appelle ces régions des loci de risque pour ce type particulier de maladie ou traits. En juillet 2019, 4054 études d'associations différentes ont permis d'identifier 93892 SNP associés à diverses maladies ou caractéristiques (http://www.genome.gov/gwastudies). Les associations avec des traits ont augmenté rapidement au cours des dernières années (Buniello et al., 2019). Cependant, il a été difficile pour les chercheurs d'interpréter les résultats de l'étude d'association GWAS.

Premièrement, contrairement à une maladie comme la drépanocytose, qui est causée par la mutation dans la région codante du gène de l'hémoglobine (substitution A→T dans le sixième codon qui transforme une Glu en Val), la grande majorité des nucléotides associés aux maladies identifiées par l'association GWAS sont rarement dans les régions codantes (5% des SNPs) (Figure 7 ci-après). En effet, la plupart des SNPs index associés à une maladie sont situés dans des régions non codantes (95%) du génome. Celles-ci sont elles-même divisées en régions intergéniques et introniques (Blattler et al., 2014; Freedman et al., 2011).

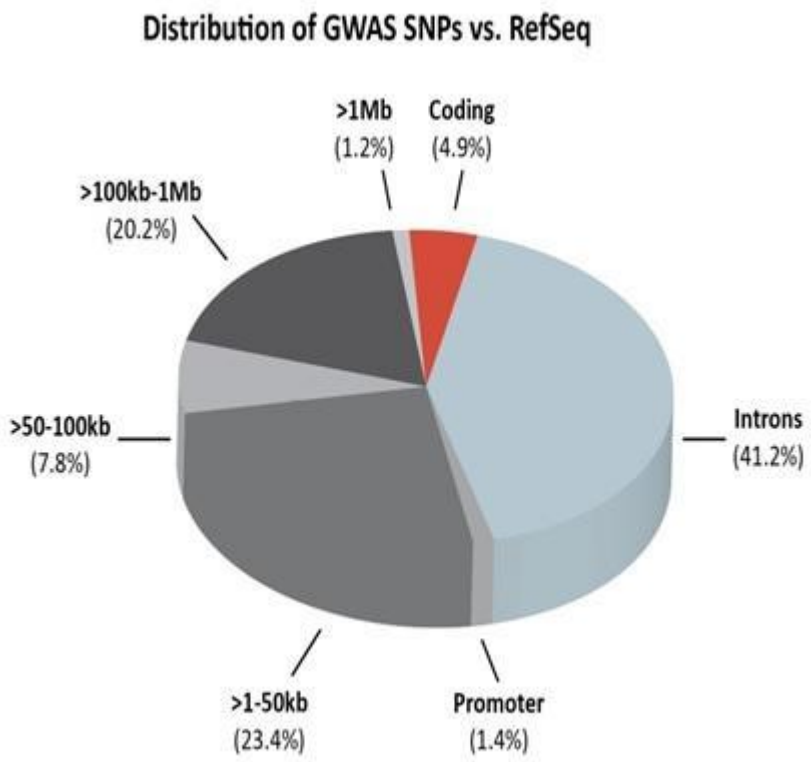


Figure 7 : Répartition des SNPs associés dans des analyses GWAS dans le génome humain selon Maurano et al (Maurano et al., 2012)*.*
On peut observer que la majorité des SNPs se situent dans des régions non codantes

Cependant, il est important de tenir compte du fait que les SNP index ne servent en fait que de représentants pour tous SNPs dans le même bloc de déséquilibre de liaison génétique. Il est très probable que d'autres SNP en déséquilibre de liaison élevée avec le SNP associé grâce à la GWAS soient les réels responsables de la maladie (Figure 8).

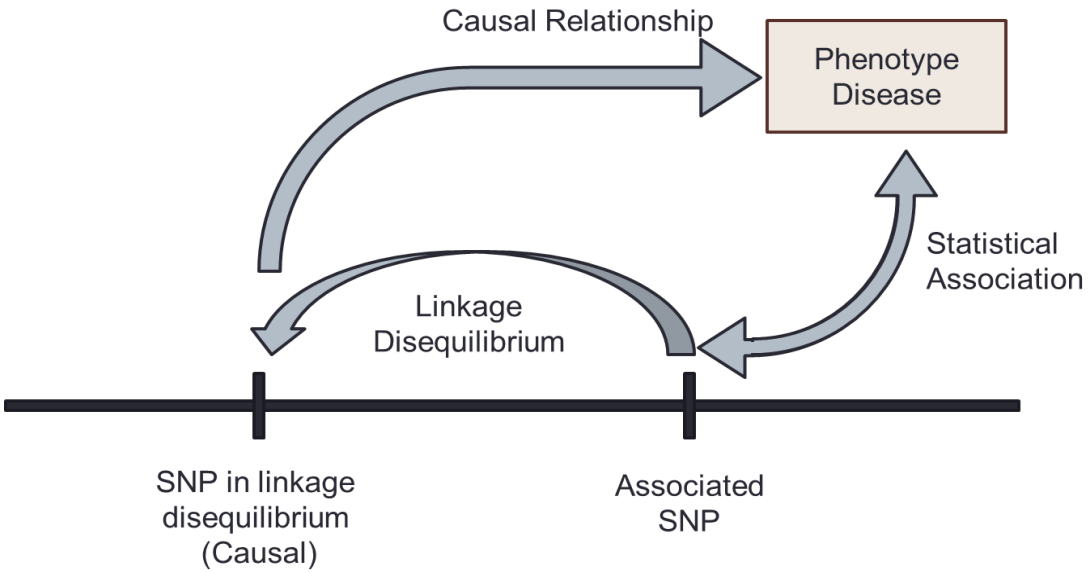


Figure 8 : Différence entre un SNP associé et un SNP causal.
Quand on effectue une analyse GWAS avec des puces, les SNPs de la puce sont analysés par un test d'association. Ces SNPs sont en déséquilibre de liaison avec une multitude d'autres SNPs et servent donc d'index. Quand un SNP est associé à la pathologie celui-ci sert donc d'index à plusieurs SNPs et parmis eux certains peuvent être des SNP causaux.

En espérant que des variants codants soient associés à la maladie et identifiés comme les véritables SNP causant la maladie, les chercheurs ont commencé à élargir leurs analyses pour inclure plus que les SNP index. Une approche couramment utilisée pour enquêter sur les SNP autres que les SNP index présents sur les puces GWAS standard a été d'utiliser le calcul LD (déséquilibre de liaison) avec le Projet 1000 Génomes. En effet, la fréquence des allèles de deux loci différents A et B est différente de ce que donnerait une association aléatoire de ces allèles. En utilisant des panels de référence dans différentes populations (Altshuler et al., 2012; Auton et al., 2015) on peut obtenir les SNPs en LD à partir d'un SNP index. Cela a pour conséquence d'élargir la liste des SNPs causaux présumés à plusieurs centaines de SNPs associés. Cependant, la plupart de ces SNPs associés en LD se trouvent également dans des régions non codantes du génome correspondant aux promoteurs ou aux régions intergéniques (Yao, Tak, Berman, & Farnham, 2014).

Une autre approche appelée cartographie fine est également utilisée pour tenter de passer des SNP index (qui identifient essentiellement de grandes régions génomiques) à une liste plus précise de SNP causaux présumés situés dans les régions identifiées. Les études de cartographie fine font appel à une plus grande quantité de génotypages qui contiennent tous les SNP courants à l'intérieur des région génomiques correspondantes (Howie, Donnelly, & Marchini, 2009) permettant

ainsi aux chercheurs d'effectuer une analyse plus complète des régions à risque (Spain & Barrett, 2015).

Cependant, ces génotypages nécessitent un grand nombre d'échantillons pour fournir la puissance statistique nécessaire à la différenciation des SNPs causaux candidats des non causaux. De plus, la création d'un génotypage spécifique des loci est assez coûteux. Par conséquent, la plupart des cartes fines ont été effectuées par des consortiums internationaux avec l'appui de l'intérêts communs à l'égard de maladies ou de caractères particuliers, comme par exemple l'Immunochip (Trynka et al., 2011), le Metabochip (Voight et al., 2012), le iCOG array (Michailidou et al., 2013), et le Oncoarray (http://epi.grantscancer/gov/oncoarray/). La majorité des cartographies fines ont été réalisées en utilisant l'ascendance européenne de la population dans lesquelles les blocs de LD sont plus longs que dans d'autres populations. Ceci exacerbe les problèmes liés à un besoin d'échantillons de grande taille pour séparer les vrais candidats les SNP causaux provenant de SNP associés à des risques moins importants (Al Olama et al., 2015; Edwards, Beesley, French, & Dunning, 2013). Toutefois, de récentes études de cartographie fine mélangeant plusieurs populations ont montré de meilleurs résultats pour la découverte de SNP causaux. En effet ce type d'approche permet d'augmenter la puissance statistique en augmentant le nombre d'échantillons et permet également d'éviter les faux positifs en mélangeant plus de SNPs en raison de facteurs confondants de stratification de la population.

Ainsi, les GWAS qui ont pointé de nombreux SNPs dans des régions non codantes indiquent qu'un changement mononucléotidique dans une région non codante pourrait conférer un risque accru dans l'expression des gènes d'une région spécifique. Ces SNP provoquent probablement des changements dans les niveaux d'expression des gènes plutôt que de causer des changements dans la fonction des protéines. En parallèle des progrès ont été réalisés en génomique et épigénomique pour intégrer les annotations des éléments régulateurs et ainsi de prioriser les SNP candidats. Divers outils informatiques aident à identifier les changements causés par les SNPs dans les régions non codantes sur l'expression des gènes impliqués dans la maladie. Enfin des approches expérimentales ont été développées pour identifier les gènes cibles et les phénotypes biologiques modifiés par des SNP non codants associés à une maladie.

- **Prioriser les SNPs en fonction des prédictions de motifs et des marques épigénétiques**

Comme nous l'avons mentionné plus haut, non seulement la grande majorité (~95 %) des SNP index dans le catalogue de GWAS a été associée avec des maladies ou des traits spécifiques mais est aussi située dans des régions non codantes. De

même la plupart des SNP en fort déséquilibre de liaison avec la plupart des SNP index associés au risque sont également situés dans des régions non codantes.

L'hypothèse actuelle est qu'un ou plusieurs de ces SNP non codants associés au risque provoquent des changements dans l'expression d'un gène critique de la pathologie. Cependant, la validation de l'effet fonctionnel (décrite ci-dessous) est à la fois coûteuse et prend beaucoup de temps. Bien que la cartographie fine aboutit généralement à un nombre plus faible de SNPs associés (par rapport au calcul de LD) car elle permet de restreindre la région d'association, elle n'a été effectuée que pour un nombre relativement faible de loci associés aux pathologies. Par conséquent, la plupart des chercheurs se retrouvent un grand nombre de SNPs candidats et il est nécessaire de prioriser les SNPs candidats.

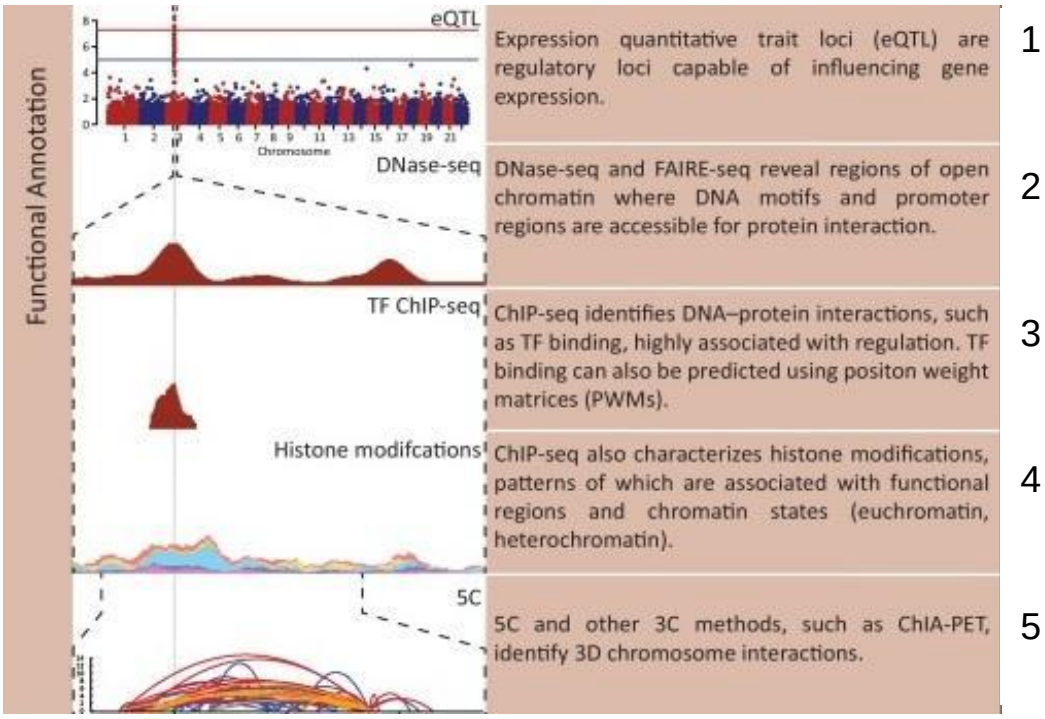


Figure 9 : Principales analyses in silico pour l'annotation des variants dans les régions non-codantes
Adapté de (Nishizaki & Boyle, 2017)

Une façon d'établir l'ordre de priorité de la liste des SNP est d'identifier ceux situés dans les régions régulatrices du génome (Figure 9). Il y a plusieurs types d'éléments impliqués dans la transcription : les promoteurs, les régions *enhancers* et *silencer* (régions de régulation distale), les éléments liés à la structure, tels que les éléments contraignants du CCCTC (CTCF), chacun de ces éléments est lié aux régions associées à des SNP non codants. Un promoteur est une région généralement sur plusieurs Kb entourant un site de départ de transcription (TSS) d'un gène codant ou non codant (les promoteurs actifs peuvent être définis par certaines marques d'histones ou par l'analyse de l'expression de l'ARN si les données sont disponibles pour ce type de cellules particuliers). Il est plus difficile d'identifier les SNP au sein des *enhancer* parce que, contrairement aux promoteurs, ils ne sont pas à une

distance définie d'un TSS. Cependant, ils peuvent être identifiés par des profils épigénomiques spécifiques. Au cours des dernières années des consortiums tels que l'Encyclopédie des éléments de l'ADN (Encyclopédie des éléments de l'ADN). (ENCODE) (Dunham et al., 2012) et la Roadmap Epigenomics Mapping Consortium (REMC) (Bernstein et al., 2010; Roadmap Epigenomics Consortium et al., 2015) ont eu recours à une variété de méthodes à l'échelle du génome pour l'étude de la chromatine dans des régions non codantes du génome humain dans des centaines de types cellulaires différents (p. ex. lignées cellulaires primaires, lignées cellulaires immortalisées et tissus). Dans ces études, ont été identifiés à l'aide de méthodes qui détectent l'ouverture de la chromatine, les modifications spécifiques des histones, et des ARN*enhancer* (ARNe). Par exemple, le DNase-seq (Maurano et al., 2012) a été utilisé pour identifier les régions d''hypersensibles à la DNase (DHS) qui correspondent à des zones ouvertes et accessibles. La chromatine contient des motifs de liaison pour les facteurs de transcription (TF). Bien que les DHS font généralement quelques Kb de longueur, l'empreinte DNase (qui combine les données séquencées par DNase-seq avec des informations sur le motif) peuvent aider à identifier avec plus de précision les nucléotides critiques pour l'ensemble des DHS ce qui comprend les régions promotrices et les régions *enhancer* distales, et les sites de fixation des TF structuraux (Boyle et al., 2011; Schaub, Boyle, Kundaje, Batzoglou, & Snyder, 2012). Afin d'affiner davantage l'ensemble des DHS distales pour n'inclure que des *enhancer* actifs, on peut utiliser la méthode du ChIP-seq et les anticorps spécifiques de certaines modifications d'histones. Par exemple, il est possible d'identifier des séquences comme étant des régions ouvertes de la chromatine avec des anticorps reconnaissant les nucléosomes ayant une histone 3 marquée par la monométhylation de la lysine 4 (H3K4me1). Les nucléosomes flanquant des enhancer pleinement actifs sont marqués par H3K4me1 et aussi par l'acétylation de lysine 27 sur l'histone H3 (H3K27Ac) (Dunham et al., 2012). De plus le niveau d'histone H3 triméthylé sur la lysine 4 (H3K4me3), est une marque des promoteurs. La marque H3K27Ac sur les *enhancers* est probablement une conséquence de la consolidation de TF spécifiques à un site particulier (par exemple TCF7L2) qui recrutent des histones acétyltransférases (HAT) tels qu'EP300 et CBP. On pense que l'acétylation des histones flanquant un DHS augmente l'affinité nette d'autres TF dans la région ouverte de la chromatine (Spitz & Furlong, 2012). Ainsi, il est possible d'identifier des *enhancers* actifs à l'aide des données de ChIP-seq des TFs. Toutefois, compte tenu du fait que les données de ChIP-seq ont identifiés environ 500 TF sur 1 800 TF connus et ceux-là dans seulement quelques types de cellules, la combinaison des DHS et des modifications d'histones sont plus couramment utilisées pour identifier les *enhancers* (Maurano et al., 2012). Par ailleurs, des études récentes ont identifié des *enhancers* actifs en utilisant des changements de niveaux de méthylation de l'ADN dans les régions distales des promoteurs (Roadmap Epigenomics Consortium et al., 2015; Yao, Berman, & Farnham, 2015; Yao, Shen, Laird, Farnham, & Berman, 2015). Enfin, une approche

différente a été utilisée par le FANTOM5 basée sur l'analyse de l'expression génique à l'aide d'un "capuchon" (CAGE) pour découvrir des *enhancers* actifs qui produisent des ARNs coiffés bidirectionnels. Bien que très peu d'entre eux aient été identifiés à l'aide de cette méthode, un pourcentage élevé de ces *enhancers* ont été validés par les chercheurs (Andersson et al., 2014). Il est également important de noter que les *enhancers* sont très spécifiques du type de cellule et, par conséquent, ces *enhancers* doivent correspondre dans le(s) type(s) de cellule(s) pertinent(s) à la maladie étudiée.

Plusieurs études ont montré que les SNPs index et/ou les SNP en LD élevé avec les SNP index sont enrichies dans les régions d'*enhancer* (Coetzee et al., 2016; Schaub, Boyle, Kundaje, Batzoglou, & Snyder, 2012). Par exemple, une étude a constaté que les SNP index non codant de 426 GWAS sont enrichis en *enhancers* présents dans les types de cellules concernés et que plusieurs des SNPs indexés ont créé ou perturbé la fixation de TF dans les *enhancer* identifiés (Ernst et al., 2011)

Malheureusement, bien que des progrès aient été réalisés quant à l'identification des motifs des TFs via les données de ChIP-seq (J. Wang et al., 2013), il n'existe pas d'attribution d'un motif connu spécifique pour la plupart des TFs. Toutefois, des outils ont été élaborés pour permettre aux chercheurs d'effectuer des recherches sur les SNPs et d'y incorporer des informations sur l'ensemble des TFs. L'utilisation de tels outils pour identifier les SNP régulateurs situés dans des motifs de TF dont on sait qu'ils jouent un rôle important dans l'établissement ou le maintien des caractéristiques phénotypiques de types cellulaires spécifiques ont été identifiés. On peut citer comme outil analysant l'impact des SNP dans l'altération de site de TF comme *scan-variation with motif* de RSAT ou encore motifbreakR (Coetzee, Coetzee, & Hazelett, 2015). Toutefois, il convient de noter que des études ont été réalisées et ont montré que de nombreux SNP associés au risque (SNP indexés et SNPs qui sont en LD élevé avec l'index SNPs) ne sont pas précisément situés dans des motifs conservés de TFs mais sont dans des régions voisines (Farh et al., 2015; Heinz et al., 2013). Il est possible que de tels SNPs perturbent un motif encore inconnu pour un TF dont la séquence n'a pas encore été caractérisée par ChIP. Une autre possibilité est que les séquences en dehors de la liaison TF de base affectent la liaison d'un autre TF. Des travaux récents ont suggéré que l'environnement des motifs, y compris la séquence, la composition, les caractéristiques de la forme de l'ADN, et un taux global élevé de similitude avec le motif peut contribuer à changer l’affinité de liaison des TF avec diverses séquences d'ADN (Dror, Golan, Levy, Rohs, & Mandel-Gutfreund, 2015; Yang et al., 2014). Enfin, des études récentes suggèrent que seule une minorité de changements d’un seul nucléotide dans les motifs de liaison affectent réellement la liaison in vivo d'un TF (Chang, Toghiani, Hay, Aggrey, & Rekaya, 2019).

La plupart des expériences de ChIP-seq ont été réalisées en utilisant le TF CTCF qui est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, notamment la régulation de la transcription, l'activité isolateur, la recombinaison V(D)J et la régulation de l'architecture de la chromatine. ENCODE ainsi que de nombreux laboratoires, ont cartographié les sites de liaison du CTCF dans un grand nombre de types cellulaires humains. De telles études ont révélé que la CTCF se lie aux régions promotrices et *enhancers*, mais elle peut aussi se lier aux régions du génome qui n'ont pas les modifications histoniques qui spécifient les promoteurs et *enhancers* actifs. Les domaines d'association topologique (TAD), qui délimitent de grandes régions chromatiniennes qui interagissent en boucle, sont enrichis pour les sites de liaison de la CTCF à leurs limites, ce qui suggère un rôle pour les boucles médiées par le CTCF dans le maintien des TADs (Sexton & Cavalli, 2015). On pense également que le CTCF contribue à la structure tridimensionnelle globale de la chromatine en formant une boucle à travers laquelle les promoteurs et les *enhancers* distaux peuvent être rapprochés, ce qui pourrait conduire à une activation transcriptionnelle du promoteur associé (Ong & Corces, 2014). Il a également été démontré que le CTCF sert d'isolant ce qui interfère avec l'interaction entre un *enhancer* et un promoteur. Par conséquent, les SNP régulateurs qui perturbent ou créent un site de la CTCF peuvent être hautement prioritaires pour les analyses. Nous notons qu'une analyse combinée des SNP des GWAS pour de nombreuses maladies et caractères complexes n'a pas montré d'enrichissement pour les sites CTCF (Finucane et al., 2015). Toutefois, il est possible que seul un sous-ensemble des sites du CTCF soit pertinent sur le plan fonctionnel en ce qui a trait à la variation du GWAS (p. ex. les sites structurels de la CTCF peuvent avoir un score d'enrichissement différent de celui des sites de la CTCF qui relèvent des éléments régulateur). Il est également possible que les variations sur les sites du CTCF ne jouent un rôle que dans des maladies spécifiques. Cette constatation est cohérente car de nombreux risques associés à l'utilisation des SNPs ne sont pas dans le motif de fixation conservé de TF, mais se trouvent dans des régions voisines.

Enfin, les SNP situés dans les sites de CpG ont été etudiés pour leur implication avec les maladies. De toute évidence, si un site CpG à l'intérieur d'un motif connu pour un TF est identifié comme un SNP associé à une maladie, il pourrait modifier la régulation des gènes simplement en changeant l'affinité de fixation d'un TF pour cette région. En fait, plusieurs sites de liaison de TF hébergent des dinucléotides CpG à des positions critiques dans leurs motifs (Blattler & Farnham, 2013; Blattler et al., 2014). Cependant, les CpG peuvent également réguler l'expression des gènes dans une région plus spécifique. De plus, des études récentes ont montré que l'hyper- et l'hypo-méthylation d'éléments distaux peuvent être liée à des changements spécifiques dans l'expression des gènes (Yao, Shen, et al., 2015). L'augmentation de la méthylation d'un promoteur ou l'enhancer est généralement considérée comme conduisant à la transcription alors qu'une diminution de la

méthylation conduirait à l'activation des gènes. Ainsi, un seul changement d'allèle au niveau d'un SNP (qui perturbe ou augmente la liaison) d'une TF en affectant la méthylation de l'ADN) peut conduire à un modèle épigénétique modifié d'une plus grande région.

Tel que décrit ci-dessus, l'identification des SNP régulateurs doit faire l'objet d'une recherche afin de déterminer si les SNPs associés sont situés dans des promoteurs, des *enhancers*, dans des sites de liaison pour des TFs ou des ilots CpG. Bien qu'on puisse déterminer si l'un ou l'autre de l'ensemble relativement restreint de SNPs index d'une maladie particulière est située dans une région régulatrice cartographiée. En visualisant simplement l'emplacement de l'élément SNP et la localisation d'éléments fonctionnels sur un génome il serait assez laborieux de le faire pour plusieurs centaines de SNPs en LD élevé avec les SNPs index. Par conséquent, plusieurs programmes différents ont été mis en place qui intègrent l'information génétique (génotypage et données d'imputation pour les SNPs et SNPs de GWAS ainsi que les SNPs en LD des SNPs) avec des informations épigénétiques (générées par les par DNase-seq, ChIP-seq, ou méthylation de l'ADN) et des données sur l'interaction de la chromatine.

Par exemple, RegulomeDB (Boyle et al., 2012) et HaploReg (L. D. Ward & Kellis, 2012) partagent des caractéristiques similaires, fournissant automatiquement toutes les informations épigénétiques connues pour toutes les cellules disponibles types et tissus pour les SNPs candidats (les cartes épigénétiques sont dérivés des bases de données ENCODE et REMC). Toutefois, ni l'un ni l'autre des programmes n'a la possibilité d'analyser uniquement les types de cellules pertinents pour les SNP associés à la maladie. En revanche, FunciSNP (Coetzee, Rhie, Berman, Coetzee, & Noushmehr, 2012), GREGOR (Schmidt et al., 2015) et Enlight (Guo, Conti, & Wang, 2015) permettent aux utilisateurs d'ajouter leurs données épigénétiques spécifiques à partir du type de cellule d'intérêt (qui peut ne pas être dans les bases de données publiques), ce qui permet une priorisation des SNP régulateurs. Il est à noter que GWAS3D (Li, Wang, Xia, Sham, & Wang, 2013) et Enlight (Guo et al., 2015) incluent une analyse automatique des caractéristiques d'interaction de la chromatine (bien que de telles données ne soient pas encore disponibles pour de nombreux types de cellules), et Enlight génère automatiquement des tracés montrant les informations LD.

- **Priorisation des SNPs associés à une maladie spécifique en se basant sur l'expression des gènes**

Une deuxième façon d'établir l'ordre de priorité des SNP associés au risque consiste à se concentrer sur le sous-ensemble de SNPs associés à une différence d'expression génique. Les méthodes basées sur la population identifient l'expression les loci de caractères quantitatifs (eQTL), qui sont définis en tant que régions

génomiques qui abritent un ou plusieurs SNPs (les variants) qui sont en corrélation avec des différences dans l'expression des gènes. Les eQTLs sont des " sites " nucléotidiques précis (c-à-d. des SNP) qui sont corrélés avec les différences dans l'expression génétique (Albert & Kruglyak, 2015). Les eQTLs peuvent être associés de façon statistiquement significative avec des gènes qui sont plus ou moins proches du gène en question. S'il est associé à un gène proche la relation est appelée "eQTL local", alors que si les SNPs associés à des gènes situés plus loin sur le même chromosome ou sur des chromosomes différents sont appelés "eQTLs distaux". Dans de nombreux cas, les eQTLs locaux fonctionnent sous forme de cis-eQTLs, qui affectent directement l'expression des gènes (généralement limités aux gènes compris entre 250 Ko et 1 Mo) d'une manière spécifique aux allèles (Albert & Kruglyak, 2015; Gibson, Powell, & Marigorta, 2015). En revanche, les transQTLs affectent probablement l'expression des gènes identifiés comme conséquence secondaire des changements dans l'expression des cibles directes. La plupart des trans-eQTLs sont les eQTL distaux, étant associées à des gènes trouvés loin des SNPs sur le même chromosome ou sur des chromosomes différents (Pai, Pritchard, & Gilad, 2015). Toutefois, il convient de noter que certains membres de trans-eQTLs sont des cis-eQTLs, le gène associé est affecté sous forme de conséquence secondaire des changements dans l'expression des gènes d'un gène cible direct. La plupart des études portent sur les cis-eQTLs (Pai et al., 2015) parce que les trans-eQTLs nécessitent de multiples tests pour obtenir des résultats statistiques puissants (Westra et al., 2013).

Pour les analyses eQTL, les SNPs sont cartographiés à l'aide d'un génotypage et l'abondance de l'ARNm est mesurée par puce ARN ou, dans des études récentes, par RNA-seq en utilisant des centaines d'échantillons de lignées cellulaires ou de tissus qui sont pertinents pour la maladie ou les caractères à l'étude. Les tests statistiques (test de corrélation) sont ensuite utilisés pour associer les SNPs aux données de transcriptomiques pour identifier les eQTL (Gibson et al., 2015). Il est important de noter que toutes les cartes d'eQTL (en particulier ceux issus d'études de grande envergure) ne sont pas liées à la maladie ; en d'autres termes, certains SNPs associés à l'expression génique n'ont pas été identifiés via l'association GWAS. Toutefois, de nombreuses études ont révélé que les eQTLs peuvent être situé dans des loci associés à la maladie ; dans ces cas, l'association du SNP avec l'expression du ou des gènes à proximité est spécifique à un caractère ou à une maladie (Nicolae et al., 2010; X. Zhang et al., 2014).

Bien que certaines eQTLs soient partagées entre différentes types cellulaires la plupart des associations eQTL sont spécifiques à un type de cellule donné (Dimas et al., 2009; Emilsson et al., 2008). Ces eQTLs spécifiques de type cellulaire sont souvent assez éloignées du gène auquel ils sont associés. De plus, ils ont souvent de faibles effets sur l'expression des gènes, reflétant les caractéristiques d'éléments *enhancers* (Dimas et al., 2009). L'utilisation des informations épigénétiques

d'ENCODE et du REMC au niveau fonctionnel annote 4085 eQTLs intergéniques. Une étude récente a identifié l'enrichissement des SNPs eQTL dans les éléments distaux, mais la relation avec l'expression du gène au SNP n'est apparue qu'après la stimulation immunitaire de monocytes humains naïfs par du LPS afin de mimer le sepsis (Fairfax et al., 2014), ce qui suggère que de nouveaux *enhancers* hébergeant des SNP eQTL ont été créés par des stimuli immunitaires. Plusieurs études ont suggéré que les changements dans la liaison des TF sont un événement majeur dans un type de cellule spécifique, cela entraîne des changements dans la structure de la chromatine, la modification des histones, ou la méthylation, ce qui a un impact dans l'expression des gènes (McVicker et al., 2013).

- **Approches expérimentales pour identifier les gènes cibles des SNP régulateurs et des SNP eQTL**

Bien que les chercheurs utilisent souvent l'annotation fonctionnelle ou eQTL pour identifier les SNP prioritaires (Figure 9 ; collectivement appelés SNP fonctionnels candidats), l'utilisation d'une approche combinée peut aider à classer les listes SNP pour une étude de suivi. L'ensemble des SNP régulateurs (en particulier ceux obtenus à l'aide de LD élevés et non par cartographie fine) est généralement plus important que l'ensemble des eQTL. Par conséquent, le fait de déterminer si l'un ou l'autre des nombreux *enhancers* qui renferment des SNP associés à un risque et également des eQTL, pour un ou plusieurs gènes, peut identifier un sous-ensemble de *enhancers* associés à un risque plus élevé d'avoir un impact sur l'expression génétique. Par conséquent, le fait de déterminer quels SNP eQTL sont également situés dans une région de régulation pourrait aider à établir la priorité de la liste. Après avoir identifié un ensemble de SNP régulateur et/ou eQTL, la prochaine étape logique est la validation le suivi fonctionnel des éléments régulateurs candidats hébergeant les SNP. Cependant, il n'est pas facile de déterminer le gène cible réel d'un élément régulateur. Il est communément admis qu'un SNP associé à un risque qui se situe dans une région promotrice influence l'expression de ce gène particulier. En fait, si le gène en question a une fonction biologique connue compatible avec la possibilité qu'il puisse influencer le phénotype cellulaire d'une manière compatible avec la maladie étudiée, alors les chercheurs vont souvent directement étudier ce gène. Cependant, certains ont émis l'hypothèse que les promoteurs peuvent interagir avec d'autres promoteurs (Sahlén et al., 2015) et qu'ils peuvent aussi avoir une activité activatrice qui influence l'expression d'autres gènes (Andersson, Sandelin, & Danko, 2015). Il peut donc être prématuré de supposer que les SNP situés près de l'extrémité 5′ d'un gène n'influencent que la régulation de ce gène en particulier. Il est encore plus difficile de prédire quel gène est directement régulé par un *enhancer* parce qu'il peut être situé en aval d'un TSS, il peut réguler les gènes de manière indépendante de l'orientation et, surtout, il peut sauter des gènes voisins pour réguler des gènes plus lointains. Ainsi, bien qu'une hypothèse soit que le gène

le plus proche d'un promoteur ou d'un *enhancer* qui abrite un SNP régulateur est le gène lié à la maladie, dans la plupart des cas, cette hypothèse n'a pas été prouvée (ni même testée). Cependant, il existe des approches qui peuvent être utilisées pour identifier expérimentalement les gènes cibles des éléments de régulation qui abritent les SNP fonctionnels candidats. Pour ce faire, il faut manipuler la région génomique contenant les SNPs en question et déterminer si l'expression d'un gène cible est altéré et/ou par des tests expérimentaux. Les interactions peuvent être testées entre la région qui abrite le SNP et le gène cible putatif en utilisant des tests d'interaction.

- Délétion ou modification épigénétique de la régulation distale éléments hébergeant les SNP fonctionnels candidats

Une approche pour l'identification d'un gène cible d'un gène distal est de supprimer ou de modifier épigénétiquement l'élément et étudier les effets subséquents sur l'expression génique. Nous notons que la suppression ou l'inactivation d'une région entière d'un promoteur entraînerait automatiquement la suppression de l'expression de ce gène (ce qui le rend difficile de déterminer le rôle exact du SNP), l'analyse de SNP fonctionnels candidats situés dans les promoteurs devrait commencer par des méthodes de ciblage spécifiques décrites ci-dessous. Une méthode traditionnelle pour l'étude d'un élément régulateur distal dans le génome de cellules cultivées ou dans un modèle de souris a été d'enlever ou de remplacer un élément de régulation de type sauvage par un élément de régulation muté en utilisant la loxP et la Cre recombinase. Bien que ces résultats soient prometteurs, l'utilisation du système loxP-Cre a des inconvénients. Par exemple, le clonage des plasmides nécessaires à la recombinaison homologue est laborieux et l'insertion de la séquence d'ADN étranger loxP dans le génome pourrait potentiellement affecter l'expression de gènes (Meier et al., 2010). Des technologies récentes telles que les protéines à doigts de zinc (ZFP), les protéines TALEs (Transcription Activator-Like Effectors) ou le système CRISPR/Cas9 (RNA-guided Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ont permis aux chercheurs de cibler la fonctionnalité des éléments génomiques dans le système endogène dans presque tous les organismes (Hsu, Lander, & Zhang, 2014). Les éléments de régulation peuvent être supprimés du génome sans l'introduction de séquences exogènes. De plus, le même système génomique peut être utilisé pour modifier épigénétiquement le processus génomique grâce à l'injection des séquences contenant un SNP associé au risque. Le système CRISPR/Cas9 avec deux éléments est le plus utilisé. Il est composé de la nucléase Cas9 et un guide ARN (sgRNA) qui peut se lier à une séquence d'ADN cible spécifique pour recruter Cas9 à cet emplacement génomique, ce qui se traduit par une coupure double brin de l'ADN (DSB) (Barrangou, 2014; Sander & Joung, 2014). La construction de CRISPRs nécessite seulement le clonage de séquences d'ARN qui s'hybrideront aux sites cibles (Hsu et al., 2014). Une étude récente a montré que les méthodes TALE et CRISPR/Cas9 sont très spécifiques du site étudié.

En raison de la facilité du clonage, les rapports faisant état d'un ciblage avec une spécificité élevée (Hsu et al., 2014), et l'accessibilité des ARN guides pour de l'ADN méthylé (Hsu et al., 2013), la plupart des chercheurs ont commencé à utiliser le système CRISPR/Cas9 pour induire des cassure double brin dans les cellules humaines. La délétion d'éléments régulateurs par CRISPR nécessite de cibler par les nucléases des deux côtés de l'élément. Les DSBs se produisent aux deux sites cibles, ce qui entraîne des modifications de séquence locales à chaque site cible et la délétion de la séquence intermédiaire. Des études récentes ont montré que des régions génomiques allant de plusieurs paires de base à plusieurs milliers peuvent être supprimées (Kraft et al., 2015; Webster et al., 2014), l'efficacité de la délétion ayant une corrélation inverse avec la taille de la région supprimée (Canver et al., 2014). La fréquence d'obtention de délétions biallélіques dans des cellules normales ayant un nombre de chromosomes diploïdes est beaucoup plus élevée que dans des régions génomiques à copies multiples (créées par amplification ou augmentation du nombre de copies chromosomiques) comme lorsque des cellules cancéreuses sont ciblées. Dans la plupart des cas, de nombreux clones doivent être analysés pour différentes raisons. La première est le cas des effets *off targets* (Zhang, Tee, Wang, Huang, & Yang, 2015) en effet les mutations hors cible sont encore répandues et pourraient se produire avec aussi peu que 3-5 nucléotides différents entre l'ARNg et la séquence d'ADN cible. La seconde pour identifier les cellules qui n'ont pas toutes les copies de l'élément régulateur à l'étude (élément régulateur muté). Il est également important de garder à l'esprit que si un élément régulateur joue un rôle important dans le contrôle de l'expression d'un gène essentiel, la suppression de toutes les copies de cet élément du génome pourrait affecter la prolifération ou la survie cellulaire (Canver et al., 2014); dans ce cas, les cellules présentant une perte monoallélique ou partielle des copies de l'élément (dans le cas des cellules cancéreuses aneuploïdes) devront être analysées.

Plusieurs études récentes ont utilisé les nucléases génomiques pour supprimer des éléments régulateurs et identifier les gènes cibles. Hnisz et al. ont supprimé plusieurs pics de H3K27Ac à l'intérieur d'un important *enhancer* des cellules souches embryonnaires et ont montré que chaque *enhancer* a modestement contribué à l'expression d'un gène cible (Hnisz et al., 2015). Une autre méthode pour identifier les gènes cibles des SNP fonctionnels candidats distaux consiste à moduler l'état chromatinique de l'élément en utilisant une Cas9 "morte" sans activité nucléase (dCas9) fusionnée à un domaine modifiant la chromatine ; ces systèmes techniques sont appelés "commutateurs épigénétiques". Les constructions Cas9 ayant le domaine KRAB devraient augmenter les marques de méthylation des histones. Une étude a suggéré que dCas9-KRAB est plus efficace que TALE-KRAB pour inactiver les enhancers, peut-être à cause de l'entrave stérique causée par les dCas9 liés dans la prévention du recrutement de facteurs d'activation (Gao et al., 2014). Il est intéressant de noter que l'action de dCas9-LSD1 (Kearns et al., 2015;

O'Geen et al., 2017) s'est avérée spécifique des enhancers avec très peu de conséquences si elle cible les promoteurs. En revanche, dans une autre étude, dCas9-KRAB s'est révélé plus efficace sur les promoteurs, ce qui se traduit par une augmentation de H3K27me3 ou H3K29me3 au niveau des promoteurs ciblés, mais pas au niveau des enhancers (Kearns et al., 2015).

- Ciblage spécifique des SNP fonctionnels candidats

Une fois que l'on a démontré que la délétion ou la modification épigénétique d'un élément régulateur distal a des conséquences fonctionnelles grâce à la délétion ou l'inhibition de la région, une analyse plus détaillée peut être effectuée pour étudier les effets des allèles à risque et identifier des nucléotides importants spécifiques au sein de l'élément de régulation. Dans les approches traditionnelles, ont été utilisés des tests luciférase pour étudier les sites individuels de fixation de TF activateurs. L'avantage d'utiliser des tests de luciférase est de pouvoir tester l'activité *enhancer* et promoteur pour l'allèle à risque et pour l'allèle de non risque dans un plasmide hors du contexte chromatinien de la cellule. Par contre les effets peuvent être biaisés si l'on n'emploie pas le bon promoteur ou le bon type cellulaire. Des études plus récentes ont utilisé le génie génomique pour comparer des données endogènes par rapport à des éléments régulateurs mutés. Quand le CRISPR/ Cas9 fait une cassure à double brin, les cellules peuvent utiliser pour réparer la cassure soit le système de réparation non homologue (NHEJ) soit le système de réparation homologue (HDR) (Sander & Joung, 2014). Cependant, comme le système NHEJ entraîne de petites insertions ou délétions au site de clivage, cette méthode peut également être utilisée pour perturber les motifs TF si un guide ARN est précisément ciblé sur le motif. Une autre façon d'étudier les effets précis de la délétion ou de la modification d'un SNP est de fournir une séquence modifiée de la région, et d'utiliser la réparation par la voie HDR. En fournissant, avec le guide ARNs, la Cas9, un fragment d'ADN original donneur qui est identique à la séquence génomique mais contient l'allèle SNP alternatif ou une mutation de TF, un échange précis de régions génomiques peut être réalisé (Okamoto, Amaishi, Maki, Enoki, & Mineno, 2019; Y. Sun et al., 2019).

Bien que la HDR soit moins efficace que le NHEJ, le fait que ce mécanisme puisse être utilisé pour échanger des fragments d'ADN entre un plasmide et le génome en fait la méthode de choix pour étudier les différences spécifiques du SNP. Plusieurs études ont utilisé CRISPR/Cas9 et l'édition du génome à médiation HDR pour modifier les SNPs chez la souris et les systèmes de modèles de culture cellulaire (Claussnitzer et al., 2015; Han, Slivano, Christie, Cheng, & Miano, 2015). La méthode la plus courante consiste à introduire des plasmides qui expriment les ARN guides et Cas9, ainsi qu'un plasmide qui contient la séquence du donneur (p. ex. un fragment activateur dont le SNP est changé en l'autre allèle). D'autres études ont rapporté une efficacité accrue de l'édition du génome à médiation HDR en utilisant des ARN guides purifiés et des ARNm Cas9 à la place des plasmides d'expression

et des oligodésoxynucléotides monocaténaires ayant des bras homologiques à la place de l'ADN double brin (Haoyi Wang et al., 2013).

- **Analyses fonctionnelles liées à la maladie**

Comme décrit ci-dessus, une approche intégrée et ordonnée devrait être utilisée pour étudier le rôle des SNPs non-codants dans l'expression des gènes. À savoir, après l'établissement des priorités du SNP, une combinaison de la suppression ou de la modification d'une disposition régulatrice plus les analyses eQTL peuvent fournir une liste des éléments selon les gènes cibles candidats. Toutefois, une analyse de régions non codantes contenant les SNPs associés au risque n'est pas complète sans d'autres caractérisations de la façon dont les gènes dont l'activité est influencée par un SNP particulier affectent l'initiation, la progression, ou la manifestation de la maladie à l'étude. Identifier le(s) gène(s) causal(aux) permettra de mieux comprendre la maladie et peut-être aussi de fournir de nouveaux diagnostics ou thérapies.

Il est probable que la manipulation d'un élément régulateur ou que les analyses eQTL permettront d'identifier plus précisément un gène cible potentiel. Mais il peut être difficile de savoir quels gènes doivent être testés dans des tests phénotypiques. Les chercheurs choisissent souvent des gènes causaux présumés basés sur la proximité de régulation, (b) le degré auquel l'expression est affectée, ou (c) une fonction de gène qui peut être facilement imaginée pour contribuer au risque de maladie. Chacun de ces choix peut poser des problèmes. Par exemple, comme nous l'avons vu plus haut les gènes, ne sont pas nécessairement proches de leurs éléments régulateurs. De plus les changements dans la production de l'ARNm n'ont pas forcément d'incidence sur les niveaux d'expression de protéines (Battle et al., 2015; Ghazalpour et al., 2011) et donc les gènes qui montrent les changements les plus importants dans le l'ARNm ne produira pas nécessairement les changements les plus importants en protéines. Enfin, la fonction des gènes est souvent assignée en fonction de la première série d'expériences effectuées sur ce gène ; de nombreux gènes fonctionnent en réseaux, souvent dans un tissu ou un type cellulaire d'une manière spécifique. Si l'une des cibles potentielles est testée avec des résultats négatifs, cela pourrait signifier soit que le SNP candidat n'est pas réellement lié ou qu’un mauvais contexte expérimental a été utilisé. Une approche pour faire face à cette incertitude est d'abord de mettre au point un essai fonctionnel dans le cadre de quels effets peuvent être observés lorsque de la suppression ou de la modification de l'élément hébergeant le SNP ; si l'élément le permet d'affecter un phénotype cellulaire particulier, alors les gènes cibles candidats individuels peuvent être par la suite étudiés en utilisant le même test.

B) Approches génétique et transcriptomique de la susceptibilité au sepsis

Dans la suite de ce chapitre, l'accent sera mis sur 2 aspects. Le premier volet concerne les études de liaison et d'association génétiques ayant mis en évidence des gènes associés à des phénotypes cliniques. Le second volet concerne les études transcriptomiques qui révèlent des profils d'expression génique associés à ces mêmes phénotypes.

- **SNPs associés au sepsis**

L'un des problèmes est que le mot sepsis est un mot qui peut désigner plusieurs phénotypes liés notamment à différents degrés de sévérité de la maladie. On peut trouver dans la base de données SNP curator qui effectue une analyse de texte mining (non publié), qui utilise un système de text mining plus orienté vers l'extraction d'information spécifiquement dans l'étude du génome et des gènes candidats, 810 SNPs associés à des termes comme sepsis, infection, bactériémie, choc septique ou tuberculose. Parmi les gènes associés à ces phénotypes, on retrouve 16 gènes codant pour une cytokine, mais aussi des gènes de 80 récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), 20 gènes codant pour une chemokine.

De plus, dans une autre base de données comme GWAS catalog (Buniello et al., 2019), toutes les études GWAS étant admissibles (identifiées par une recherche documentaire et évaluées) permettent d'extraire les SNPs associés au caractère déclaré, les associations significatives de SNP-trait et les métadonnées d'échantillons. Il y a 45 SNPs de plus associés au terme choc septique (Rautanen et al., 2015), sepsis (Rautanen et al., 2015; Scherag et al., 2016) ou bactérémie (Gilchrist et al., 2018; Rautanen et al., 2016). GWAS catalog nous donne les gènes associés à ces SNPs. Cela nous permet d'identifier 78 gènes qui sont localisés à proximité. Ces gènes pouvent voir leur expression dérégulée par ces SNPs parmi ceux-ci, 3 gènes DOCK (DOCK2, DOCK3 et DOCK7) et 2 gènes STAT (STAT1 et STAT4) sont identifiés.

Enfin, une étude publiée en 2019 par Lu et al.(Lu et al., 2019) a permis d'identifier 349 articles admissibles qui portaient sur 405 variants de 172 gènes distincts. Les auteurs ont effectué 204 méta-analyses primaires sur une population complète et 185 méta-analyses sur des sous-groupes (enfant, adulte, etc...) pour 76 variants dans 44 gènes. Les résultats ont montré que 29 variants de 23 gènes étaient significativement associés au risque de sepsis, dont 8 variants dans des gènes de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), 14 variants dans des gènes de cytokines, 1 variant (rs1801274) dans le gène relié à la réponse immunitaire FCGR2A et enfin 6 variants dans d'autres gènes. De plus, les preuves épidémiologiques d'une association significative entre chaque variant et le risque de sepsis ont été classés comme fortes ou modérées pour 18 variants. Pour les 329 variants comptant moins de trois populations étudiées, 63 variants de 48 gènes ont

été signalés comme étant significativement associés au risque de sepsis dans une revue systématique.

Quand on compare les 3 bases de données on obtient 78 SNPs pour 41 gènes différents qui sont retrouvés dans au moins 2 bases de données (voir liste de ces gènes dans le tableau 3 ci-dessous).

Gènes	SNPs
BPI	rs4358188
CD14	rs2569190
CISH	rs2239751; rs414171
CRP	rs3091244
CXCL12	rs1801157
FER	rs4957796
IFNG	rs2069705; rs2069718; rs2430561
IL10	rs1800871; rs1800872; rs1800896
IL12B	rs3212227
IL17	rs763780
IL18	rs187238; rs1946518
IL1A	rs1800587
IL1B	rs1143627; rs1143643; rs143634; rs16944
IL21	rs12508721; rs907715
IL4	rs2243250
IL6	rs1800795; rs1800796
IL8/CXCL8	rs4073
IRAK1	rs1059702
IRAK-4	rs1461567; rs4251513
LBP	rs2232618
LTA/TNFB	rs2229094; rs909253
MASP2	rs2273346; rs72550870
MBL2	rs1800450; rs1800451; rs7096206
MCP-1	rs1024611; rs2857656
MyD88	rs6853
NFKB1	rs28362491
NFKBIL2	rs4925858; rs760477
NLRP3	rs35829419
NOD1	rs6958571
NOD2	rs2066844; rs2066847
RAGE	rs1800625
TIRAP	rs595209; rs8177374; rs8177375
TLR1	rs4833095; rs5743551; rs5743618
TLR2	rs3804099; rs3804100; rs5743708
TLR4	rs10759932; rs11536889; rs2149356; rs4986790; rs4986791; rs7873784
TLR9	rs187084; rs352139; rs352140; rs5743836
TNFA	rs1799724; rs1799964; rs1800629
TNFRSF1A	rs4149570
TNFRSF1B	rs3397
TOLLIP	rs3750920; rs5743867
TREM-1	rs2234237; rs2234246

Tableau 3: SNPs associés au sepsis et leurs gènes associés pouvant être dérégulés par le SNP

- **Caractérisation de la réponse transcriptomique dans le sepsis**

Plusieurs études ont essayé de caractériser le transcriptome des patients ou de cellules stimulées dans un modèle in vitro. On peut ainsi différencier plusieurs phases de sepsis. La première est le pic inflammatoire de la réponse immunitaire suivi par la résolution immunitaire et enfin la suppression immunitaire.

- Pic inflammatoire

Fairfax et Al ont décrit dans leur papier (Fairfax et al., 2014), que lors de la stimulation, les monocytes présentent une transcription génique à grande échelle avec production de cytokines, traitement antigénique amélioré et migration cellulaire accrue.

Dans leur étude, Shalova et al. ont effectué une caractérisation transcriptomique des monocytes de sang humain isolés à partir de patients septiques(Shalova et al., 2015); 1 170 gènes ont été trouvés affectés par la septicémie (561 régulés à la hausse et 609 à la baisse).Ils ont montré que les monocytes régulent à la hausse un grand nombre de cytokines telles qu'IL-1β, IL-6, CCL3, CCL5, et IL-10 et les facteurs de transcription tels que NFκb et le phospho régulateur-IκBa pendant la septicémie.

Dans leur revue, (Chousterman, Swirski, & Weber, 2017) se sont intéressés à la réponse des cytokines dans la réponse septique et ont montré que les premières cytokines transcrites sont les principales molécules inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-1β) auront plus ou moins la même cinétique avec un pic rapide entre 1,5 et 2h et une diminution rapide aux niveaux basaux (presque indétectable) après 6 h. Les molécules anti-inflammatoires (IL-10, IL-1RA, TNF-SRI) et chimiokines (IL-8, KC, MIP-2, GRO-α) auront une évolution parallèle. Dans ce papier les auteurs pointent du doigt l'étude de Calvano et al. (Calvano et al., 2005) de 2005 où les auteurs ont montré que les prélèvements sanguins pro-inflammatoires effectués chez des patients après l'apparition de l'endotoxémie (apparition de molécules bactériennes) ont montré que les expressions de gènes pro-inflammatoires telles que TNFSF2 (TNF), IL-1α, IL-1β, CXCL1 (GRO-α), CXCL2 (GRO-b), CCL2 (MCP-1), CXCL8 (IL-8) et CXCL10 atteignent un pic à 2-4 h avec augmentation ultérieure du taux de transcriptions NFκB1, NFκB2, RELA et RELB. La période de 4 à 6 heures s'est avérée critique en raison de l'augmentation des gènes de réponse initiale et des gènes de régulation de la famille des facteurs de transcription : STAT gènes, c-AMPponse element binding protein (CREB), SOCS3 et IKKB, ou cytokines anti-inflammatoires : IL1RAP, IL1R1, IL10 et TNFRSF1A.

- Réponse inflammatoire et immunosuppression

Davenport et al. (Davenport et al., 2016) ont défini le profil de tolérance aux endotoxines en utilisant deux ensembles de données sur la tolérance aux endotoxines humaines dans la base de données GEO du NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), accession GSE15219 publié par Fresno & al.

(Fresno et al., 2011) et GSE22248 publié par Pena & al. (Fjell et al., 2015; Pena, Pistolic, Raj, Fjell, & Hancock, 2011). L'expression de ces gènes de réponse lipopolysaccharidique dans les cellules stimulées une fois a ensuite été comparée à leur expression dans des cellules du même sujet qui avaient été traitées deux fois pour identifier les gènes à réponse différenciée. La combinaison de ces deux études a permis de définir une signature moléculaire de tolérance aux endotoxines comprenant 398 gènes dont 331 ont été mesurés chez les patients septiques dans leur études.

Pena & al (Fjell et al., 2015; Pena et al., 2011) ont étudié la tolérance à l'endotoxine dans les cellules mononucléaires. Ils ont observé que ces changements de réponse étaient semblables à ceux qui se produisent dans les macrophages polarisés M2 mais pas totalement identique, ce qui les amène à proposer que la tolérance aux endotoxines représente un état distinct de polarisation M2. Leurs observations ont révélé la régulation à la baisse d'une grande variété de médiateurs pro-inflammatoires (TNF, Cox2, CCL-3, CCL-20) ainsi qu'une augmentation de la production d'IL10. Il a été montré que l'induction d'une tolérance aux endotoxines redirige les processus biologiques en désactivant les fonctions susmentionnées tout en activant d'autres fonctions immunologiques telles que la chimiotaxie, la prolifération cellulaire et, notamment, les processus de cicatrisation tels que la régulation positive des VEGF et protéoglycanes Les TFBS des membres de la famille des ETS comme ETS-1, ELF-1 et SPI1 qui sont impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire, le développement vasculaire et la migration cellulaire, sont également significativement surreprésentés pendant la tolérance aux endotoxines. Ces résultats pourraient également être liés à la hausse du MCP-1 (CCL-2) observée dans leurs expériences sur la durée de la tolérance aux endotoxines (paralysie du système immunitaire), puisque le MCP-1 a déjà été lié à la régulation de l'angiogenèse par activation du facteur de transcription ETS-1.

Fresno et al (Fresno et al., 2011) ont analysé la réponse transcriptomique des monocytes pendant la tolérance aux endotoxines. Leur analyse globale du transcriptome monocytaire a révélé que la plupart des gènes différentiellement exprimés pouvaient être regroupés en deux grandes classes : NT (non tolérant) et T (tolérant), selon que ces gènes soient induits ou non dans des cellules tolérantes lors d'une seconde exposition au LPS, et en parfait accord avec les données récemment publiées. Alors que les gènes de classe T sont principalement des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, IL-6, et IL-12, la classe NT est plus variée et comprend des facteurs antimicrobiens, des régulateurs négatifs de la signalisation inflammatoire et un marqueur bien connu d'activation alternative IL-10. Ils ont également observé la surexpression de deux autres facteurs importants dans la tolérance des monocytes : un régulateur négatif de la voie TLR, la pseudokinase IRAK-M (7, 11, 18) et l'amplificateur des réponses immunitaires innées, TREM-1. Outre la surexpression des régulateurs négatifs de l'inflammation et des facteurs

antimicrobiens, ils ont observé une augmentation du marqueur de la phagocytose, le récepteur CD64 de surface cellulaire sur les monocytes humains tolérants associée avec une altération de la présentation de l'antigène. Ils ont observé que plusieurs autres facteurs impliqués dans la présentation de l'Ag sont régulés à la baisse dans les monocytes tolérants. Il a été suggéré que la régulation à la baisse de la classe II du CMH dans les monocytes tolérants résulte de l'inhibition du MAPK p38 pendant la phase de tolérance aux endotoxines. Leurs résultats indiquent que les monocytes tolérants présentent une réponse inflammatoire réduite, c'est-à-dire une capacité phagocytaire accrue associée à une capacité conservée de tuer les agents pathogènes internalisés, mais que leur fonction de présentation de l'Ag est altérée. D'une part, une faible activité pro-inflammatoire associée à une capacité phagocytaire élevée pourrait éviter le développement d'un choc septique, tout en permettant une clairance bactérienne. D'autre part, l'échec de la présentation de l'Ag inhibe un passage approprié à une réponse immunitaire adaptative. Ainsi, un juste équilibre entre les états réfractaire et inflammatoire semble être une solution de compromis dans les situations cliniques.

Objectif et justification du projet

Mon travail de thèse s'est développé sur 2 axes le premier porte sur la caractérisation de la réponse transcriptomique de cellules immunitaire du péritoine lors de l'injection de LPS chez la souris et sa comparaison avec les réponses transcriptomiques chez l'homme lors du sepsis ou dans les modéles de cellules cultivées soumises au LPS. La seconde a été d'étudier l'impact fonctionnel de facteurs génétiques impliqués dans la résistance ou la susceptibilité aux sepsis chez l'homme en combinant des approches génétiques, bio-informatiques et moléculaires.

Dans cette première partie je me suis intéressé à l'étude de la réponse transcriptomique des cellules péritonéales lors de l'injection de LPS issus de Pseudomonas aeruginosa, chez la souris. Nous avons regardé la réponse à 2 temps différents au cours du pic inflammatoire et juste avant leur décès. Ce qui m'a permis de mettre en évidence la signature transcriptomique ainsi que les mécanismes specifique de certains points clés lors de cette réponse dans le modèle murin. De plus j'ai comparé cette réponse à des modèles humains. Les résultats m'ont permis de montrer que le modèle souris reflétait en partie les observations faites chez les patients. Ceci permet d'envisager des études dans ce modèle pour documenter des relations de cause à effet et tester notamment le rôle de certains gènes dans la physiopathologie du sepsis.

Dans une seconde partie, le but a été d'identifier les SNPs causaux pouvant avoir un rôle régulateur et de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'association de ces polymorphismes dans la mortalité précoce au sepsis (avant 7 jours) ou tardif (entre 7 et 28 jours), j'ai souhaité caractériser leur effet cis-régulateur par des bio-informatiques et approches fonctionnelles. Je suis parti des résultats d'une analyse GWAS effectuée au laboratoire et le but a été dans un premier temps d'identifier les SNPs en déséquilibre de liaison, à partir de SNPs associés, se situant dans des régions non codantes proches de gènes pouvant avoir un impact dans la réponse immunitaire de l'hôte lors de la pathatologie, dans la population européenne. Puis d'identifier via des approches bioinformatiques ceux qui pouvaient avoir un rôle dans la régulation de gènes, pouvant expliquer les différents phénotypes, en se situant dans des régions régulatrices comme les *enhancers*, les *silencers* ou les promoteurs. Cela m'a permis d'identifier des SNPs n'étant pas encore associés au sepsis de manière biologique. Ensuite le but a été de valider l'impact du SNP identifié sur sa cible pour cela nous avons utilisé la technique de Crispr-Cas9 pour déleter la région régulatrice où se situe le SNP et tester l'activation du potentiel gène cible par qPCR dans un modèle cellulaire d'activation de la réponse immunitaire via LPS ou IFNgamma. La dernière étape a été de tester l'impact de la mutation rs143356980, SNP ayant été identifié comme ayant un effet régulateur, par des tests de luciférase qui m'a permis de montrer l'impact régulateurs des 2 allèles.

Ces 2 projets mettent en évidence des mécanismes de régulation, chez l'homme, des gènes clés de la pathologie qui sont impliqués dans la survie des patients atteints de sepsis.

Résultats

Résultat 1

Transcriptional response in a sepsis mouse model reflects transcriptional response in sepsis patients

Rosier F[1,2], Fernandez N[1,2] , Torres M[1,2], Loriot B[1,2], Rihet P[1,2, †], Pradel LC[1,2,†]

[1]INSERM, UMR_S_1090 TAGC, Marseille, F-13288, France

[2]Aix-Marseille Université, Marseille, F-13288, France

[†]These authors jointly supervised this work

Correspondence to:

Lydie Pradel, TAGC INSERM1090, Campus de Luminy case 928, 163 Av de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France : lydie.pradel@inserm.fr ; Tel +33 4 91 82 87 45

Pascal Rihet, TAGC INSERM1090, Campus de Luminy case 928, 163 Av de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France : pascal.rihet@univ-amu.fr ; Tel +33 4 91 82 87 23

Abstract

Mortality due to sepsis remains unacceptably high, especially for septic shock patients. Murine models have been used to better understand the pathophysiology mechanisms. However, they have been challenged because of the failure in humans of therapies demonstrating promise in preclinical mouse models. There is still a debate on the ability of the mouse model to recapitulate the pathophysiology mechanisms. Here we investigated the transcriptional response of mice injected with LPS, and compared it with that of human cells stimulated in vitro with LPS on the one hand, and with that of blood cells in septic patients on the other hand. We

identified a molecular signature composed of 2346 genes with an FDR median of 0%. This molecular signature was highly enriched in regulated genes in peritoneal macrophages stimulated with LPS. There was a significant enrichment in signaling pathways such as, TNF, IL-17 , cytokine-mediated, chemokine, NF-kappa B, Toll-like receptor, NOD-like receptor, MAPK, and JAK-STAT signaling pathways, and in disease terms, such as pneumonia, sepsis, systemic inflammatory response syndrome, severe sepsis, inflammatory disorder, immune suppression, and septic shock. Moreover, there was a significant overlap on the one hand between the genes up-regulated in mouse and human cells stimulated with LPS, and on the other hand between the down-regulated genes in mouse and human cells stimulated with LPS. Finally, genes up-regulated in mouse cells stimulated with LPS were enriched in genes up-regulated in susceptible septic patients, who were at high risk of death. Similar results were found when comparing genes down-regulated in mouse cells stimulated with LPS and genes down-regulated in susceptible sepsis patients. Our results support the hypothesis of common molecular and cellular mechanisms between mouse and human sepsis. Also, we propose that the mouse model can be used to assess the pathophysiological role of genes and pathways, which show common features between sepsis mouse model and sepsis patients.

Introduction

Sepsis is a multifactorial clinical disease characterized by a dynamic clinical course and a diverse clinical outcome depending of several factors such as the physiopathology process, the environment and the phenotype of the affected patients. Sepsis results from a complex dysregulation of inflammation inducing an incapacity of the host to control an infection. Then, an exacerbated response of the immune system injures its own tissue and induces a severe sepsis (sepsis with organ dysfunction) and septic shock, the dreaded complications of this pathology. It has been proposed more recently that an immunosuppression phase occurs later, leading to an increased risk of mortality. According to the WHO, there is more than

30 million of new case of sepsis per year leading to 6 million deaths. The prevalence of the disease is probably higher in low and middle income countries. Sepsis can occur after patients infections acquired either in the community setting or/and in health care facilities. Murine models remain very useful to decipher the main causes of sepsis (Stortz et al., 2017). Among the available models, direct injection of toxins such as LPS into the blood, peritoneum or lung induces a strong inflammatory response that mimics the innate immune system in humans (Buras, Holzmann, & Sitkovsky, 2005; Poli-de-Figueiredo, Garrido, Nakagawa, & Sannomiya, 2008). The advantage of this method allows a technical ease and a reproducible response of the immune system with the injection of controlled amount of toxin. Here we performed a transcriptomic study from cells extracted of the peritoneal cavity after LPS injected in mouse. We provide evidence of a mouse transcriptional response that reflects both the response of human blood cells to bacteria and the risk of mortality in sepsis patients.

Material and methods

Mice and Experimental Procedure.

Twelve C57BL/6SJL mice were purchased from from the Charles River laboratory (L'Arbresle, France). C57BL/6SJL mice were housed under specific pathogen-free conditions and handled in accordance with French and European directives (EU Agreement N° A-13013 03). To model severe form of sepsis, mice were intraperitoneally injected with 200 µL (35 mg/kg) of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* (L9143, Sigma-Aldrich®). The mice were sacrificed by cervical rupture before injection T0 (n=4) and 1 hour after LPS injection during the inflammatory peak T1 (n=4) or 40 hours after LPS injection, just before the death T2 (n=4). Peritoneal cavity cells were collected by peritoneal washes using PBS.

RNA isolation and cDNA preparation for real time RT-qPCR validation.

Total RNA was extracted using the RNeasy extraction mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and treated with DNase I (Qiagen). The quality of RNA was confirmed

using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany) with Agilent RNA 6000 Nano Chips. Samples with a RIN higher than 8 were used. The quantity was measured using Qubit™ RNA Assay Kits on Qubit® 2.0 Fluorometer. For real time RT-qPCR, reverse transcription reactions were performed using random hexamers and the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Gene expression was evaluated using the SYBR green PCR master mix (PE Applied Biosystems, Foster, CA, USA) on Stratagene MX3000P (Agilent). Specific primers used are listed in Table 1.

Gene Expression Microarray.

Labelling of RNA was done as recommended by Agilent Technologies using the One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low input Quick Amp Labeling. The Agilent microarray slides used is the SurePrint G3 mouse G3 8x60K chip harbouring 62,976 probes including 39,430 coding RNAs and 16,251 LincRNAs (long intergenic non RNA coding). The slides were scanned with "The Agilent Microarray Scanner®". Visualization and results were retrieved using Feature Extraction® software. The raw data as well as the QC report were recorded. Twelve samples were used for analysis after quality validations.

Statistical analyses

The "AgiND" library loaded into R was used for standardizing microarray data. This library was developed for the diagnosis and standardization of Agilent chips. First, the raw data were transformed into log2 and then normalization was performed by the method of quantiles. A first filter was used to remove the controls, used to validate the correct hybridization. Then, a second filter was applied, allowing to remove the probes whose signal was close to the noise. Only probes with an expression greater than background noise were retained for all samples in a study group, or 25880 probes. For statistical analysis, we used TMeV software to perform a SAM (Significance Analysis of Microarray) to determine our differentially expressed genes. We used the False Discovery Rate (FDR) approach to correct for multiple

tests; we applied an FDR median of 0%. A hierarchical clustering was further performed, using Pearson correlation coefficients, for the differentially expressed genes.

For RT-qPCR data, target gene levels were normalized based on B-Actin level (not observed difference in microarray analysis) and quantified by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Kruskal-Wallis test was used to compare gene expression levels in different conditions. Spearman correlation test was performed to assess the correlation between microarray and RT-qPCR results for each gene.

Functional annotation and enrichment of functional terms.

Functional analysis was performed with "Enrichr" to identify the biological processes and molecular function, in which genes are involved on the basis of "Gene Ontology" (GO) terms as well as the visualization of biological pathways from "KEGG" (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). We also checked the disease associated with these genes using DisGeNET, which is a discovery platform containing one of the largest publicly available collections of genes and variants associated to human diseases. The last database interrogated is Mouse Gene Atlas from BioGPS to find cell line enrichment in mouse tissues. The p-value is computed using a standard statistical method used by most enrichment analysis tools: Fisher's exact test or the hypergeometric test. This is a binomial proportion test that assumes a binomial distribution and independence for probability of any gene belonging to any set and then a p-value using the Benjamini-Hochberg method for correction for multiple hypotheses testing was applied to select the significant terms and pathways. A second enrichment analysis was performed using the KEGG database to visualize the pathways of genes taking into account only the number of genes found. Adjusted P-values (Q-value) under 0.05 were considered significant.

Results

Microarray gene expression profiling.

Experimental design and data analysis were performed indicated as in Figure 1. In order to identify genes modulated by LPS injection, we isolated the peritoneal cells from 8 mice during the inflammatory peak 1 hour after the injection (n=4) and, just before the death, 40 hours after LPS injection (n=4), and from 4 control mice that were not injected with LPS. The RNA samples were further extracted and used for microarray gene expression profiling and qPCR experiments. As many as 62,976 probes corresponding to 39,430 coding RNAs and 16,251 LincRNAs were used to detect mRNA expression levels for each RNA sample using SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8 × 60 K v2 Microarray Kit, and the data were analyzed using "AgiND" library loaded into "R" for standardization. Probes with intensity values below the background noise were filtered out, resulting in 25,880 probes, which were used for differential expression analysis. Out of the 39,430 coding RNAs and 16,251 LincRNAs, the expressions of 3169 probes were found to be statistically significantly different after Significance Analysis of Microarrays test with an FDR median of 0%.
Thus, 3,169 probes that were identified represented 2,369 genes differentially expressed in sepsis, including 130 LincRNAs (Supplementary Table 1). After performing our hierarchical clustering (Figure 2), we observed that all our samples were correctly classified. In addition, samples from LPS-injected mice (T1 and T2) were observed to be closer than those of control mice (T0). In addition, we observed a clustering of our probes, which were separated into 6 clusters after removing the duplicated probes for genes and genes that clustered in several groups (23 genes), 2346 genes were still differentially expressed (Supplementary Table 1). There were 109 genes in the first gene cluster, 1050 genes in cluster 2, 181 genes in the third cluster, 107 genes in the fourth cluster, 793 genes in the fifth cluster group genes, and finally 121 genes in cluster 6.

We further assessed the expression of 4 selected genes (TNF, IL1b, IL6, and IL10) by RT-qPCR to confirm the expression pattern. Gene expression level measured with microarray and that measured with RT-qPCR were correlated for TNF (Spearman’s rho=0.882, P<0.001), IL1b (Spearman’s rho=0.891, P<0.001), IL6 (Spearman’s rho=0.845, P=0.002), and IL10 (Spearman’s rho=0.982, P<0.001). Figure 4 shows differences in gene expression level. It highlights that gene

expression patterns using microarray and RT-qPCR methods were consistent. In particular, statistical analyses of RT-qPCR measurements confirmed that there was a higher level of gene expression at T2 for the 4 genes ($P<0.012$).

Functional microarray analysis.

To analyze functional annotations related to mouse sepsis, we sought biological process Gene Ontology (GO) terms, mouse gene atlas terms, KEGG pathways, and disease ontology terms for the gene whose expression was up- or down-regulated in mice injected with LPS (Supplementary Table 2). The analysis of functional terms showed an over-representation of terms related to signaling pathways such as, TNF, IL-17, cytokine-mediated, chemokine, NF-kappa B, Toll-like receptor, NOD-like receptor, MAPK, and JAK-STAT signaling pathways (Figure 5A). Noticeably, the functional term that yielded the best enrichment P value was related to the response of peritoneal macrophages to LPS (Figure 5). Furthermore, several disease ontology terms were significantly over-represented; these included Pneumonia, sepsis, systemic inflammatory response syndrome, severe sepsis, inflammatory disorder, immune suppression, and septic shock. Most of those functional or disease terms were found when analyzing the enrichment in individual clusters, as shown for cluster 3 and 6 in Figure 5B and 5C, respectively. Moreover, there was an enrichment in terms that were specific for some clusters (Figure 5B and 5C). Also, we found that genes annotated with biological process ontology terms, such as “regulation of natural killer cell chemotaxis”, “response to interferon-gamma”, interleukin-7 mediated signaling pathway”, “regulation of cytokine production involved in inflammatory response”, “and regulation of monocyte chemotaxis”, were over-represented in the cluster 6 while the TNF and NF-Kappa B signaling pathways were over-represented in cluster 3.

Moreover, we compared the list of the 2346 differentially expressed genes in mice injected with LPS with transcriptional signatures in humans. First, we compared those mouse genes with the genes regulated in primary human monocytes stimulated with LPS for 1 hour (T1) or 24 hours (T2) (Fairfax et al., 2014). There was a significant overlap between the human gene list and the mouse gene list. In particular, Figure 6A shows that 1143 genes were regulated (in the same or not way)

both in mouse cells stimulated by LPS and human monocytes stimulated with LPS for 24 hours (P=4.1 E-132). Similar results were obtained when comparing the differentially expressed genes in monocytes stimulated with LPS for 2 hours to mouse cells stimulated by LPS (P=7.9 E-80). We further looked the genes up-regulated in both mice and humans on the one hand, and the down-regulated genes in both mice and humans on the other hand. The enrichment analysis showed that there was a significant overlap between mouse and human lists (Figure 7). The comparison of the differentially regulated mouse genes with the transcriptional response of peripheral mononuclear cells stimulated with LPS (Davenport et al., 2016) showed similar results (Figure 7). In all, these results indicate that the response of mouse cells to LPS shares many features with that of human cells to LPS. This confirms previously reported results that the transcriptional response to sepsis is conserved in mouse and human peripheral blood mononuclear cells (Godec et al., 2016). Also, we compared this published conserved gene expression profiles with the gene expression profile reported here: up-regulated genes in mouse cells stimulated with LPS from Gram negative bacteria were enriched in shared up-regulated genes in mouse sepsis due to Gram negative bacteria infection and in human sepsis due to Gram positive bacteria infection (P=5.2 E-29). In the same way, down-regulated genes in mouse cells stimulated with LPS were enriched in shared down-regulated genes in mouse sepsis due to Gram negative bacteria infection and in human sepsis due to Gram positive bacteria infection (P=0.0001). Similar findings were obtained when comparing up-regulated genes in mouse cells stimulated with LPS to shared up-regulated genes in mouse sepsis due to Gram positive bacteria infection and in human sepsis due to Gram positive bacteria infection (P=1.3 E-30). This support the hypothesis that transcriptional host responses to Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria are very similar. In the same way, there were no signature genes that could differentiate between Gram-positive and Gram-negative sepsis in human peripheral blood mononuclear cells (Tang, McLean, Dawes, Huang, & Lin, 2009).

Finally, we compared the list of the differentially expressed genes in mice injected with LPS with human genes whose expression was associated with mortality in

patients with sepsis (Davenport et al., 2016). We found 372 differentially expressed mouse genes, the ortholog of which was up- or down-regulated in susceptible septic patients (P=8.9 E-36) (Figure 6B). Furthermore, Figure 7 shows that up-regulated genes in susceptible septic patients were enriched in up-regulated genes in mice at T1 (P=1.27e-05) and at T2 (P=1.87e-08). Similar enrichments were found when comparing down-regulated genes in susceptible septic patients with down-regulated genes in mice at T1 (P=8.17e-07) and at T2 (P=4.91e-21).

LincRNA study

The microarray contained 16,251 probes corresponding to LincRNAs and 4622 different LincRNAs. For each LincRNA, we had at our disposal only the genomic position and the transcription direction. For 12 of them, have a gene symbol (BRN1-A, PINC, TUG1, HOTAIR, lincP21, NEAT2, NEAT1, NRON, H19, KCNQ1ot1, TSIX and XIST) was specified.

We looked then for a new and better annotation of the LincRNAs. For this purpose, we found a symbol for the differentially expressed LincRNAs using their genomic positions in Gencode. Among the 126 differentially expressed LincRNAs in mice injected with LPS (Supplementary Table 1), we identified 1 LincRNAs (Malat1). Malat1 (transcription of lung adenocarcinoma associated with metastasis) had a functional annotation and has been associated with lung cancers.

To better identify the putative role of LincRNA differentially expressed in our experiments, we looked for the role of neighboring coding genes and hypothesized that nearby LincRNA regulates the expression of this gene. To investigate this, we used the GREAT software (http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/). Our LincRNAs list was submitted to recover the genes nearby (1000 kbp on each side of our LincRNA). The significant p-values <0.05 after the Benjamini correction were filtered, and the results are given in Supplementary Table 3. From 126 differently differentiatly expressed LincRNAs, approximately 208 genes were identified. Among those nearby genes, 40 coding genes were statistically differentially expressed in mice injected with LPS. Enrichment analysis results is shown in Supplementary Table 3 and concerns a list of 208 genes associated with molecular functions such as the direct DNA binding, binding to regulatory regions of DNA, the downregulation

of DNA-dependent transcription. We also notice an enrichment for the Zinc finger proteins and motif prediction such as the GTF3A transcription factor. Of these, 21 clusterized in the same group than the gene suggesting a possible regulation of the gene regulation by the linc RNA (Supplementary Table 3). This is the case for BCL6 and Herc6 involved in the innate immune response in cluster 3 and 5, respectively and for ASXL1 and CRABP2 involved in the regulation of retinoic acid receptor signaling pathway in clusters 2 and 5, respectively.

Discussion

The relevance of the mouse model has been debated for several years (Hotchkiss, Monneret, & Payen, 2013; Kim, Missiakas, & Schneewind, 2014; Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Rittirsch, Hoesel, & Ward, 2007; (Guillon et al., 2019). Seok et al. recently reported that transcriptional responses to acute inflammatory stresses in humans were poorly reproduced in the mouse models (Seok et al., 2013). In contrast, Takao et al. detected highly significant correlation between transcriptional responses in humans and those in mice using the same data sets and different analysis methods (Takao & Miyakawa, 2015). In the present study, we further investigated the genomic response to LPS in mice, which we compared to that in humans.

We identified many differentially expressed genes in mouse peritoneal cells stimulated with LPS using an FDR median of 0%. Those genes were enriched in genes involved in inflammation, inflammatory disorders, immune suppression, antigen processing and presentation, apoptosis, and sepsis (pneumonia, sepsis, severe sepsis, and septic shock). Significant enrichment of differentially expressed genes was also identified in several signaling pathways, such as TNF-, IL-17, Chemokine-, NF-kappa B-, Toll-like receptor-, NOD-, MAPK-, JAK-STAT-signaling pathways. Interestingly, genes that were up-regulated in cells stimulated with LPS for 1 hour (Cluster 3) were enriched in genes involved in Toll-like receptor-, TNF-signaling, and NF-kappa B pathways, whereas other clusters did not show these enrichments. It should be noted that TNF and IL10 were up-regulated in cells stimulated with LPS for 1 hour, but not in cells stimulated with LPS for 40 hours. Furthermore, genes that were up-regulated in stimulated with LPS for 1 hour and 40

hours (cluster 6) were enriched in genes involved in response to interferon-gamma, chemokine signaling pathway, and regulation of chemotaxis for both natural killer cells and monocytes, whereas other clusters did not show these enrichments. Enrichment of IL-17- and JAK-STAT signaling pathways were evidenced for both clusters 3 and 6. It is likely that this reflects an early and transitional phase related to the production of TNF and a more progressive response related to the production of gamma IFN and chemokines. Noticeably, significant enrichment of immune suppression term was found in cluster 3, indicating that this process starts quickly after stimulation with LPS. Apoptosis of immune cells has been proposed to be a key mechanism for immune suppression in sepsis patients (Hotchkiss et al., 1999; Hotchkiss et al., 2002). Besides, IL-17 that has been shown to inhibit macrophage phagocytosis and to aggravate sepsis in a mouse model (Yan, Tu, Liu, Chen, & Cao, 2019), likely participates in immune suppression.

In addition, our study of linc RNA located near differentially deregulated genes highlights the role of BCL6 known as an inhibitor of macrophage-mediated inflammatory responses (Barish et al., 2010; Nazari-Jahantigh et al., 2012; Toney et al., 2000) and involved in sepsis development as demonstrated in a recent publication in mouse model (Zhang et al., 2019).

It is very likely that macrophage peritoneal cells are mainly responsible of the response to LPS, although the peritoneal cells were not isolated in our study. Indeed, the molecular signature that yielded the best enrichment P value was that of peritoneal macrophage response to LPS for the whole list of differentially expressed genes, and for genes in cluster 3, 4, 5, and 6. This is also supported by the enrichment found for human monocytes stimulated by LPS. Also, our mouse model is restricted to a particular cell type. This is a limitation because other cell types, such as dendritic cells, T, B, and NK lymphocytes, and neutrophils are thought to be involved in the mechanisms of immune suppression (Hotchkiss et al., 2013; Ono, Tsujimoto, Hiraki, & Aosasa, 2018).

Genes up-regulated in mouse cells stimulated with LPS were enriched in genes up-regulated in human PBMC and monocytes stimulated with LPS (Davenport et al., 2016; Fairfax et al., 2014). This confirms that the transcriptional response to LPS in mice reflects at least partly that in human cells. Moreover, genes up-regulated and

genes down-regulated in mouse cells stimulated with LPS were enriched in genes up-regulated and genes down-regulated in susceptible sepsis patients, respectively (Davenport et al., 2016). Also, it is likely that there is a conserved sepsis molecular signature in human and mouse, as previously proposed by Godec et al. (Godec et al., 2016). In all, these results show that mouse models can help to better understand the pathophysiology of sepsis in humans. In particular, mouse models can be used to establish a causal relationship between, on the one hand, death due to sepsis and, on the other hand, genes and molecular pathways, for which common features have been detected in humans and mice.

In conclusion, our results support that sepsis mouse model can be used to demonstrate working hypotheses for human sepsis. More particularly, one might take advantage of our mouse model to investigate the functional role of human candidate genes and pathways in monocytes or macrophages.

References

Barish, G. D., Yu, R. T., Karunasiri, M., Ocampo, C. B., Dixon, J., Benner, C., . . . Evans, R. M. (2010). Bcl-6 and NF-kappaB cistromes mediate opposing regulation of the innate immune response. *Genes Dev, 24*(24), 2760-2765. doi:10.1101/gad.1998010

Buras, J. A., Holzmann, B., & Sitkovsky, M. (2005). Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov, 4*(10), 854-865. doi:10.1038/nrd1854

Davenport, E. E., Burnham, K. L., Radhakrishnan, J., Humburg, P., Hutton, P., Mills, T. C., . . . Knight, J. C. (2016). Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med, 4*(4), 259-271. doi:10.1016/S2213-2600(16)00046-1

Fairfax, B. P., Humburg, P., Makino, S., Naranbhai, V., Wong, D., Lau, E., . . . Knight, J. C. (2014). Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression. *Science, 343*(6175), 1246949. doi:10.1126/science.1246949

Godec, J., Tan, Y., Liberzon, A., Tamayo, P., Bhattacharya, S., Butte, A. J., . . . Haining, W. N. (2016). Compendium of Immune Signatures Identifies Conserved and Species-Specific Biology in Response to Inflammation. *Immunity, 44*(1), 194-206. doi:10.1016/j.immuni.2015.12.006

Guillon, A., Preau, S., Aboab, J., Azabou, E., Jung, B., Silva, S., . . . Translational Research Committee of the French Intensive Care, S. (2019). Preclinical septic shock research: why we need an animal ICU. *Ann Intensive Care, 9*(1), 66. doi:10.1186/s13613-019-0543-6

Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol, 13*(12), 862-874. doi:10.1038/nri3552

Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Freeman, B. D., Tinsley, K. W., Cobb, J. P., Matuschak, G. M., . . . Karl, I. E. (1999). Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med, 27*(7), 1230-1251. doi:10.1097/00003246-199907000-00002

Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E., Grayson, M. H., Osborne, D. F., Wagner, T. H., . . . Karl, I. E. (2002). Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol, 168*(5), 2493-2500. doi:10.4049/jimmunol.168.5.2493

Kim, H. K., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2014). Mouse models for infectious diseases caused by Staphylococcus aureus. *J Immunol Methods, 410*, 88-99. doi:10.1016/j.jim.2014.04.007

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods, 25*(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Nazari-Jahantigh, M., Wei, Y., Noels, H., Akhtar, S., Zhou, Z., Koenen, R. R., . . . Schober, A. (2012). MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest, 122*(11), 4190-4202. doi:10.1172/JCI61716

Ono, S., Tsujimoto, H., Hiraki, S., & Aosasa, S. (2018). Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis. *Ann Gastroenterol Surg, 2*(5), 351-358. doi:10.1002/ags3.12194

Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N., & Sannomiya, P. (2008). Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock, 30 Suppl 1*, 53-59. doi:10.1097/SHK.0b013e318181a343

Rittirsch, D., Hoesel, L. M., & Ward, P. A. (2007). The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol, 81*(1), 137-143. doi:10.1189/jlb.0806542

Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V., Xu, W., . . . Host Response to Injury, L. S. C. R. P. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(9), 3507-3512. doi:10.1073/pnas.1222878110

Stortz, J. A., Raymond, S. L., Mira, J. C., Moldawer, L. L., Mohr, A. M., & Efron, P. A. (2017). Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? *ILAR J, 58*(1), 90-105. doi:10.1093/ilar/ilx007

Takao, K., & Miyakawa, T. (2015). Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A, 112*(4), 1167-1172. doi:10.1073/pnas.1401965111

Tang, B. M., McLean, A. S., Dawes, I. W., Huang, S. J., & Lin, R. C. (2009). Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. *Crit Care Med, 37*(3), 882-888. doi:10.1097/CCM.0b013e31819b52fd

Toney, L. M., Cattoretti, G., Graf, J. A., Merghoub, T., Pandolfi, P. P., Dalla-Favera, R., . . . Dent, A. L. (2000). BCL-6 regulates chemokine gene transcription in macrophages. *Nat Immunol, 1*(3), 214-220. doi:10.1038/79749

Yan, X., Tu, H., Liu, Y., Chen, T., & Cao, J. (2019). Interleukin-17D Aggravates Sepsis by Inhibiting Macrophage Phagocytosis. *Crit Care Med*. doi:10.1097/CCM.0000000000004070

Zhang, H., Qi, X., Wu, J., Huang, X., Zhang, A., Chen, S., . . . Xia, J. (2019). BCL6 inhibitor FX1 attenuates inflammatory responses in murine sepsis through strengthening BCL6 binding affinity to downstream target gene promoters. *Int Immunopharmacol, 75*, 105789. doi:10.1016/j.intimp.2019.105789

Figure legends

Figure 1: Schematic outline representing the protocol for the experimental design for the microarray analysis in SurePrint G3 G3 8x60K mouse from Agilent. RNA were collected from peritoneal cells of mice injected in peritoneal cavity either with PBS or with LPS during the inflammatory peak (T1=1h) and before death (T2=40h).

Figure 2: Heatmap of hierarchical clustering of genes differentially expressed in our mouse model. The samples in each column (vertical) and the genes in each row (horizontal) were (re)arranged. Six horizontal and 3 horizontal clusters were obtained. Genes of similar expression pattern were placed close to each other, and samples with comparable traits were clustered (T0, T1 and T2). The heatmap indicates up-regulation (red), down-regulation (green), and mean gene expression (black).

Figure 3: Repressentation of each cluster. For each cluster heatmap of hierarchical clustering of genes differentially expressed in our mouse model and gene expression profiling associated for the cluster.

Figure 4: Expression level of TNF, IL1b, IL6, and IL10 measured by RT-qPCR (A, C, E, G, respectively) and with microarray (B, D, F, H, respectively). For RT-qPCR, values were normalized to the level of actin transcript.

Figure 5: Biological processes identified by functional enrichment analysis for all clusters (A), B) cluster 3 (B) and cluster 6 (C). The inverted Log10 of the adjusted pValue is represented.

Figure 6: Venn diagrams showing intersections of differentially expressed genes and lincRNA in our mouse model and deregulated genes in primary human monocytes stimulated for 24 hours with LPS (Fairfax et al., 2014) (A) or human genes deregulated associated with mortality in patients with sepsis (Davenport et al., 2016) (B). Intersections represent genes differentially expressed in two sets of data.

Figure 7: Enrichment analysis of common genes genes up and down in mouse and in primary human monocytes identified in the Fairfax study either stimulated 1 hour or 24 hours with LPS and in the Davenport study (Davenport et al., 2016) either in the whole cohort discovery or in the list of genes with endotoxin signature. The inverted Log10 of the adjusted pValue is represented.

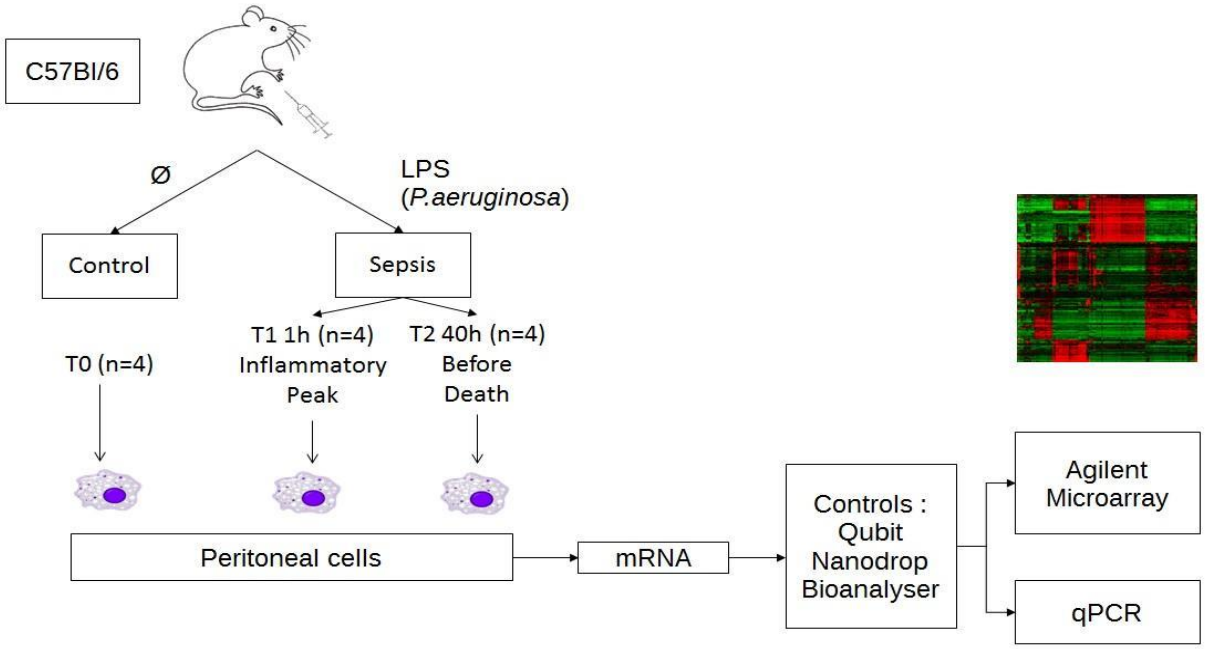


Figure 1: Experimental design and data analysis

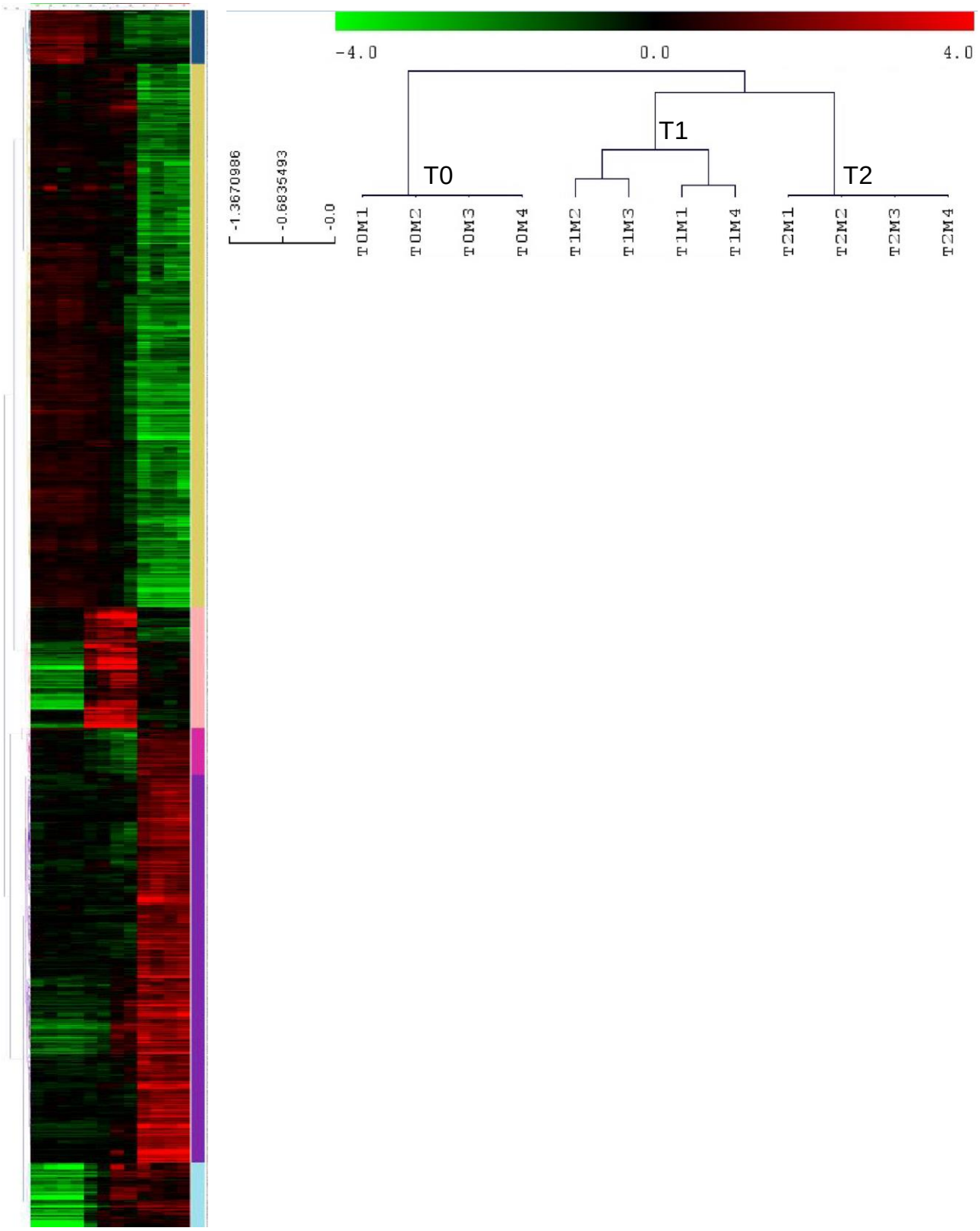


Figure 2: Probes‘s hierarchical clustering identified differentially expressed in sepsis. All 6 clusters are presented. Samples‘s hierarchical clustering

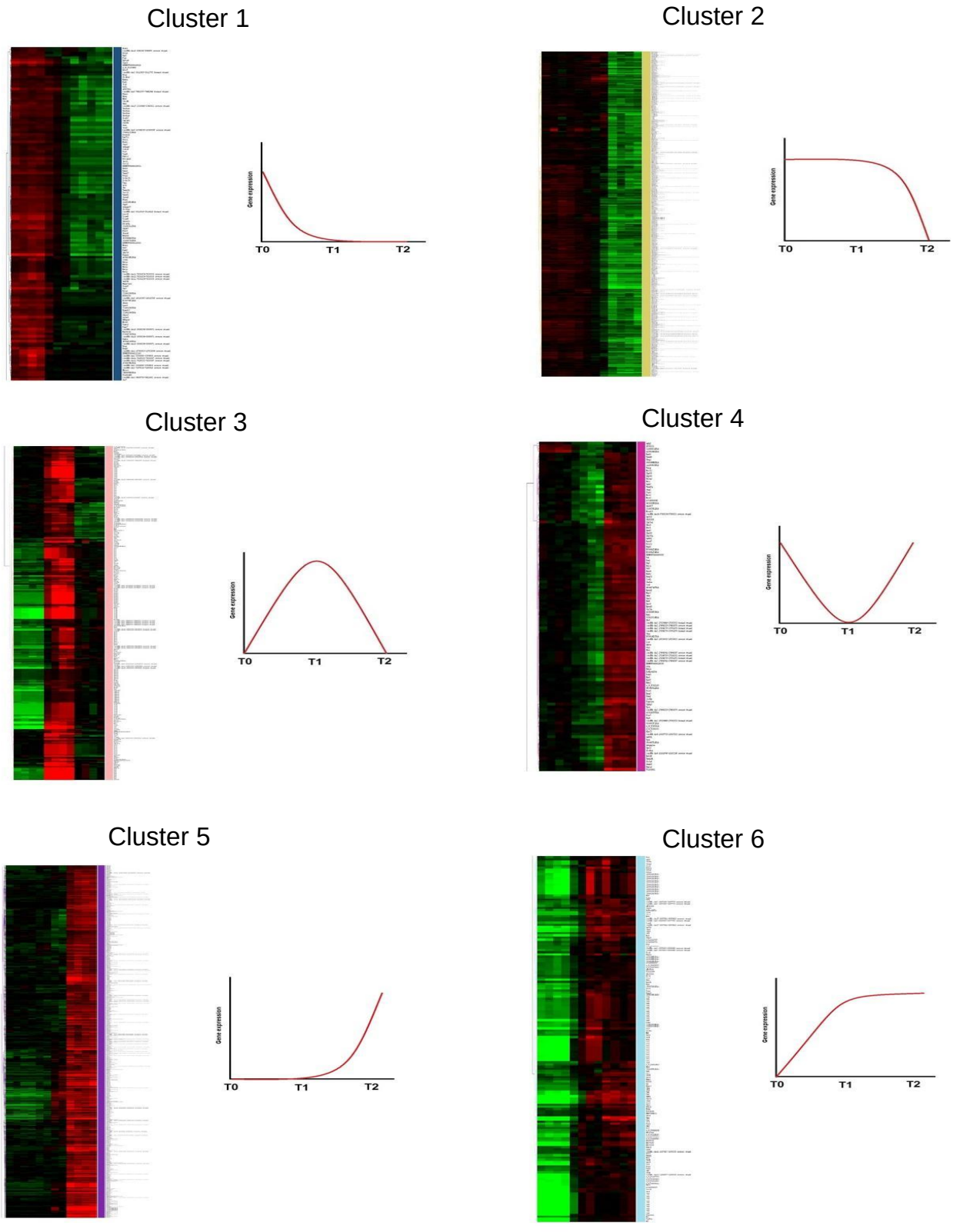


Figure 3: Probes‘s hierarchical clustering for each cluster identified differentially expressed in sepsis. Gene expression are represented for each cluster

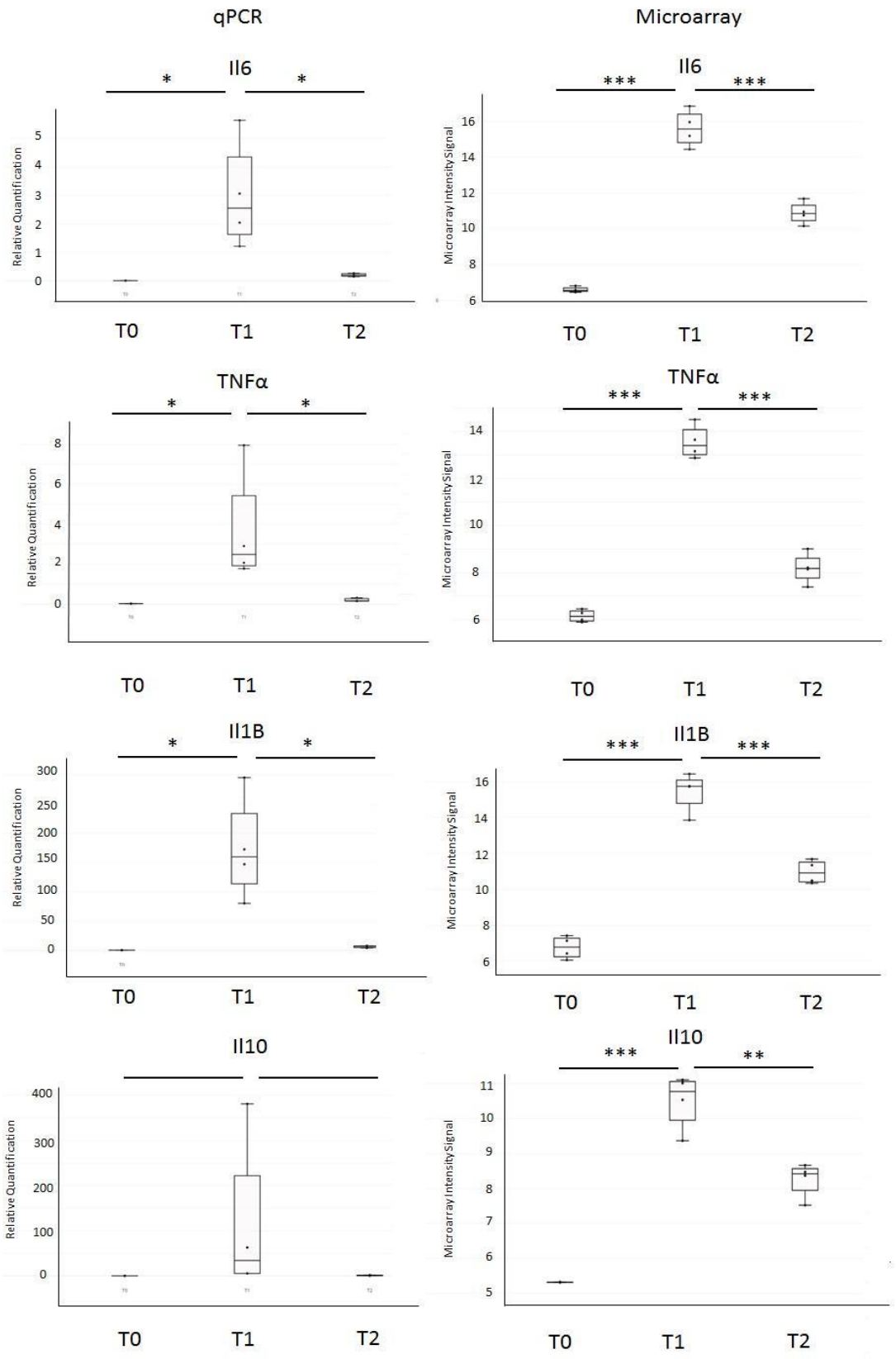


Figure 4: RT-qPCR expression level and microarray signal intensity for A) and B) IL1B, C) and D) IL6, E) and F) TNF and G) and H) IL10

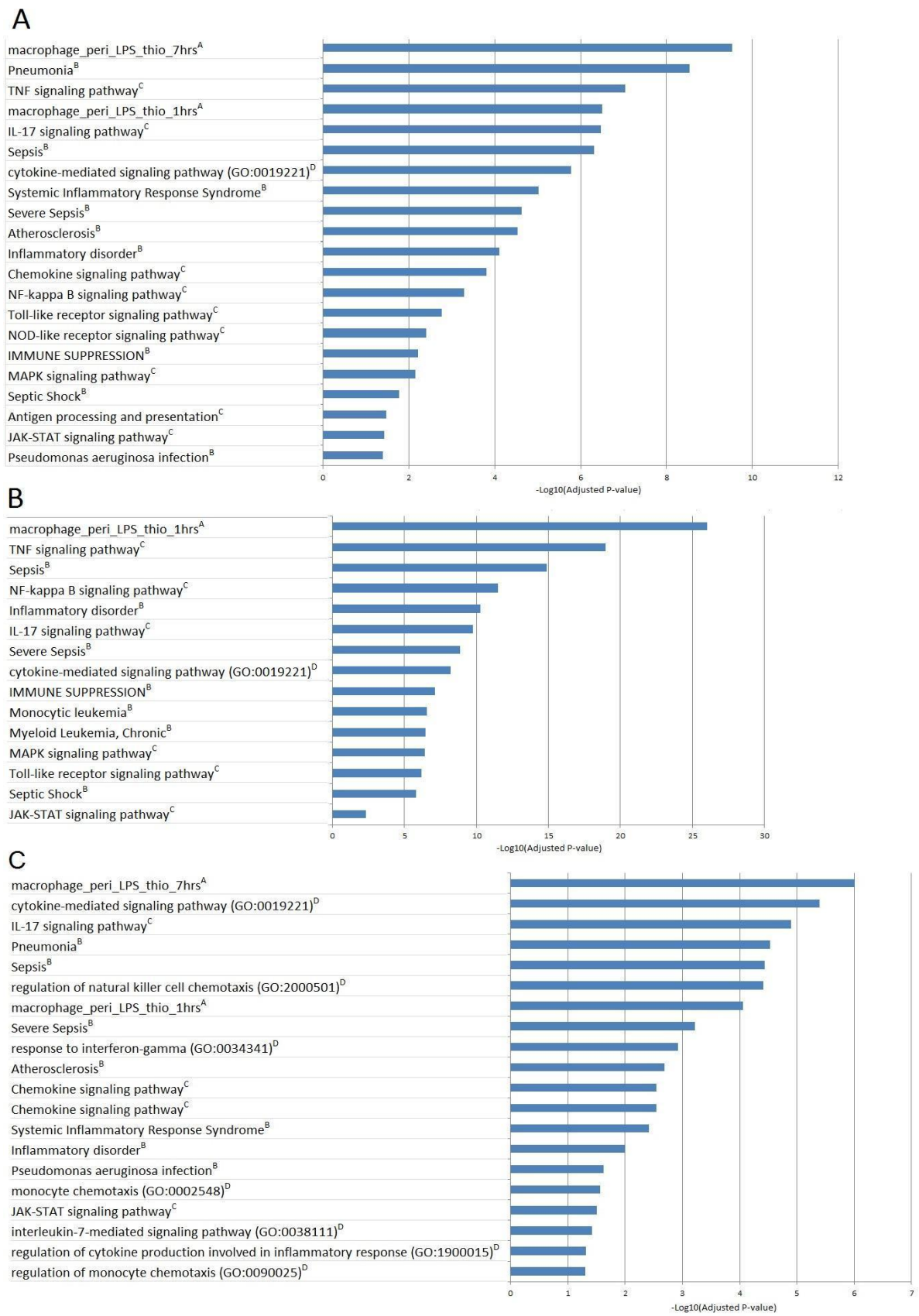


Figure 5: Functional enrichment plot of differentially expressed genes and lincRNAs for all clusters (A) cluster 3 (B) Cluster (C)

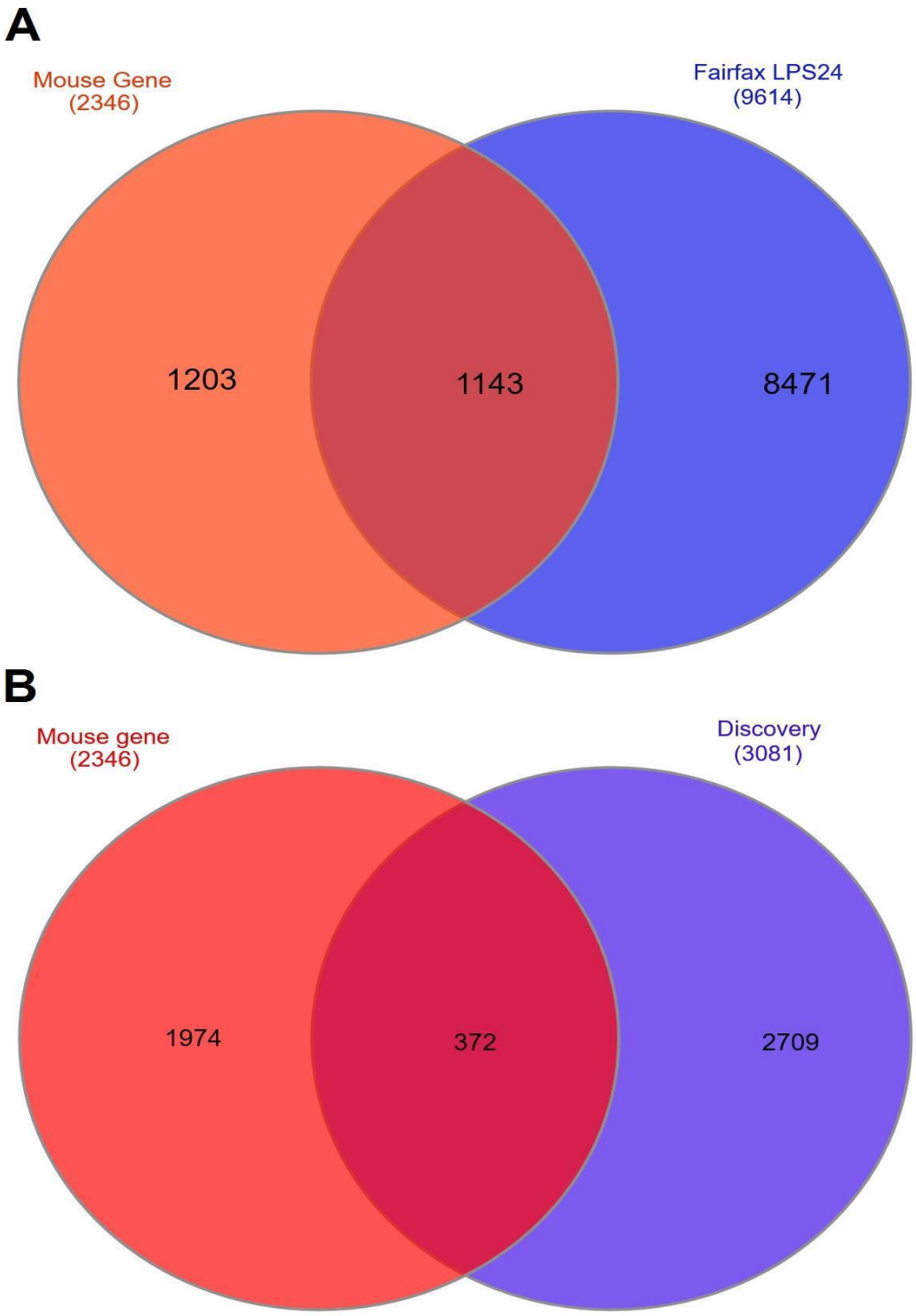


Figure 6: Venn diagrams of the intersection between the mouse genes list and the human genes list of the Fairfax study (Fairfax et al., 2014) (A) or the Davenport discovery cohort (Davenport et al, 2016) (B)

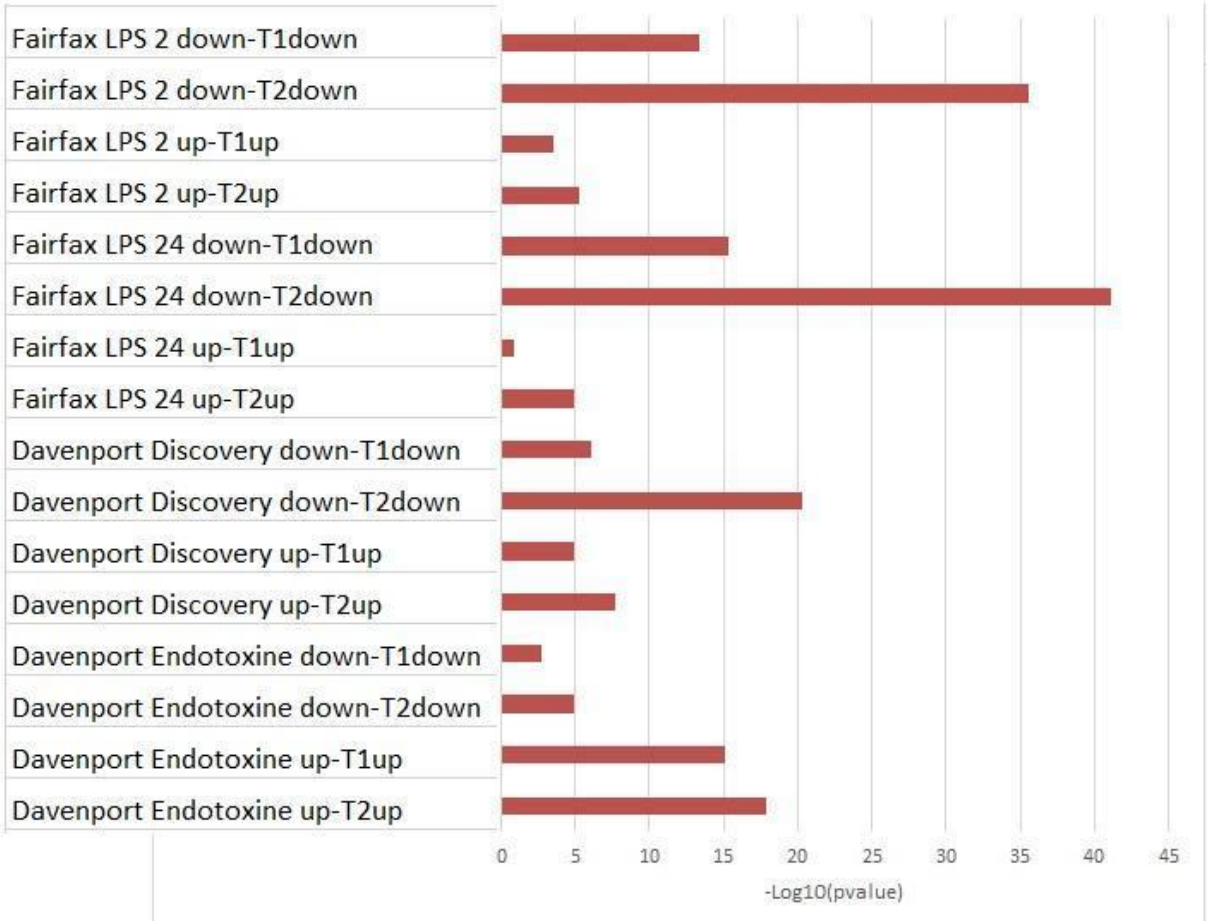


Figure 7: Enrichment analysis using hypergeometric test between common genes identified in mouse model and two other studies (Fairfax et al, 2014; Davenport et al, 2016)

Gène	Forward Primer (5‘- 3’)	Reverse Primer (5‘-3’)
β−Actin	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAACC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
TNF	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG
IL6	TGGAGTACCATAGCTACCTGGAG	TCCTTAGCCACTCCTTCTGTGACT
IL1β	GTGGTTCGAGGCCTAATAGGCT	AGCTGCTTCAGACACCTTGCA
IL10	GCCCTTTGCTATGGTGTCCTTT	TGAGCTGCTGCAGGAATGATC

Table 1: RT-qPCR primers sequences

Résultat 2

Original article

Genome-wide association and functional studies identify *CISH* genetic variants associated with mortality in septic shock patients and a *CISH* enhancer perturbed by genetic variation

Running title: Genetic polymorphisms and septic shock

Rosier F[1,2,*], Brisebarre A[1,2,*], Dupuis C[3], Baaklini S[1,2],Puthier D[1,2], Brun C[1,2,4], Pradel L[1,2], Rihet P[1,2, †], Payen D[3, †].

[1]INSERM, UMR_S_1090 TAGC, Marseille, F-13288, France

[2]Aix-Marseille Université, Marseille, F-13288, France

[3]Department of Anesthesiology and Critical Care, Lariboisière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris and UMR INSERM 1160: Alloimmunité, Autoimmunité, Transplantation, University of Paris 7 Denis Diderot, 2 rue Ambroise-Paré, 75475 Paris Cedex 10, France.

[4]CNRS, Marseille, F-13288, France

*These authors had an equal contribution

†These authors jointly supervised this work

Correspondence to:

Didier Payen, MD, PhD, Head Surgical Critical Care & SAMU, Hôpital Lariboisière, 2 Rue Ambroise Paré, 75010, Paris, France or by e-mail: dpayen1234@orange.fr; Tel +33 1 49 95 80 85

Pascal Rihet, TAGC INSERM1090, Campus de Luminy case 928, 163 Av de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France : pascal.rihet@univ-amu.fr; Tel +33 4 91 82 87 23

Abstract

Septic shock has a high mortality rate. Environmental and genetic factors influence the host response to infection, with early inflammation rapidly followed by a marked immunosuppression. To examine early (<7 days) and late (>7 to day 28) death, we performed two genome-wide association studies (GWAS) on 832 patients with septic shock, and we further integrated GWAS results with protein-protein interaction network. Association with death was observed for 139 SNPs, which were considered significant based on a False Discovery Rate of 5%. The cumulative effect of the leader SNPs at each locus was highly significant for early ($P=3.15\ 10^{-13}$) and late death ($P=9.70\ 10^{-23}$). Twenty-seven of the proteins encoded by associated genes belong to a sub-network enriched in immune pathways or pathways related to the renin-angiotensin-aldosterone systems. In the same way, the SNPs associated with death in septic shock patients were over-represented in super-enhancers of monocytes and lymphocytes. Among the 139 SNPs associated with death and the 1311 SNPs in strong linkage disequilibrium with them, we investigated 1439 SNPs within non-coding regions to identify regulatory variants. The highest IW-score was obtained for rs143356980, indicating that SNP as a strong regulatory candidate. The TAGOOS tool led to rank rs143356980 in 13^{th} position on the basis of the intergenic score, whereas it had the best score among the SNPs within chromosome 3. The rs143356980 region is a non-coding region close to the *CISH* gene. CRISPR-Cas9-mediated deletion of this region in K562 cells resulted in reduced *CISH* expression in comparison to that of non-deleted K562 cells. In addition, luciferase assays showed that rs143356980 dramatically altered enhancer activity in K562 cells. In conclusion, these analyses allowed us to identify several genes associated with either early or late death in patients with septic shock and suggest that genetic variations in key genes perturb relevant pathways, increasing the risk of death in sepsis patients. Moreover, our results suggest that a regulatory SNP alters both *CISH* expression and the risk of death in septic shock patients.

Keywords: septic shock; immunology phases; GWAS; SNPs; early and late death; protein-protein network

Introduction

The incidence of sepsis, particularly severe sepsis and septic shock, is increasing among hospital transfer, with a mortality rate between 20 and 35% despite improved strategies of care[1, 2]. After the litany of negative results from randomized clinical trials (RCTs) to reduce mortality after 28 days and/or 90 days[3-6], new aspects of sepsis have come to the front. The recent demonstration of systemic and tissue immuno-depression after a septic injury[7] and the impact of co-morbidities[8] both motivate a change in the sepsis syndrome paradigm[9]. A new therapy cannot improve the medical consequences of an underlying disease described by co-morbidities but is evaluated in terms of efficiency by differences in crude mortality rather than serving as an underlying mechanism for acute attributable mortality[10]. Research on the genetic predispositions associated with outcomes and polymorphisms for genes encoding mediators of inflammation such as TNFα[11] and IL-10[12] has been poorly replicated[13], and negative results on mortality reduction were obtained when agents blocking TNFα were tested. Despite the large number of such studies, re-analyses of accumulated evidence do not definitely show any associated genes[13]. As many other complex syndromes for which environmental and chronic disease risk factors are thought to interact with multiple genes, such analyses may benefit from recent genetic methodologies such as genome-wide association studies (GWAS)[14]. The GWAS approach has transformed genetic models for a number of other diseases[15,16].

A recent article by Rautanen *et al.*[17] describes GWAS applied to 4 different cohorts of sepsis due to pneumonia; it presents the results from the first GWAS on survival from sepsis due to pneumonia, which was assessed in a multistage study including four cohorts and tested almost 6 million single nucleotide polymorphisms. The authors have identified genetic variants within the *FER* gene showing consistent effects across the 4 cohorts studied. The rs4957796 C allele, with a near 20% frequency in European populations, was associated with reduced mortality in sepsis caused by pneumonia. As mentioned in an associated commentary[18], genetic studies should focus on specific traits related to severity and outcomes rather than on a broadly defined syndrome.

We have collaborated to provide the first human GWAS on severe sepsis or septic shock using the randomized control trial PROWESS data base[19] to test the benefits of activated protein C (aPC) use on outcome. Because of aPC treatment, sepsis prognosis models have only been tested on the control arm and were dominated by clinical variables, with the genetic markers being less informative. The recently published randomized control trial PROWESS SHOCK[5] that tested aPC exclusively on septic shock patients failed to show an outcome benefit at day 28 or 90. This negative result for septic shock prompted us to perform GWAS on outcome specific traits using the complete PROWESS dataset from septic shock patients. The present

study reports the first identification of genetic variants associated with the prognosis of septic shock when co-morbidity levels and systemic inflammation intensities are integrated. Furthermore, we included in our approach that differing mechanisms may cause early versus late death[20,21]. Also, we investigated the association of genetic variants with both early death and late death. We further focused on the region most significantly associated with late death and assessed the regulatory activity of a non-coding region containing SNPs associated with late death and close to the *CISH* gene.

Results

Patients and covariates

Tables 1 and 2 summarize the clinical characteristics and the differences between groups with early or late deaths. The patients who died early were older than the other patients, and they had higher IL-6 plasma levels at day 1. Patients who died after day 7 were also older than the survivors but had a higher incidence of cardiomyopathy. For the genetic association studies, only the significant parameters were included in the model. For the early death analysis, the data were adjusted for age, IL-6 level and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score; for the late death analysis, the data were adjusted for age, cardiomyopathy presence, aPC treatment and SOFA scores.

Genome-wide association analysis

Supplementary Tables 1 and 2 list the SNPs considered significant based on a FDR of 5%. Table 3 lists the SNPs selected after the Bonferroni correction. Here, we describe the genes and their genetic variants using the following criteria: 1- the gene contains at least one SNP associated with mortality based on a threshold of significance of approximately $5.58\ 10^{-8}$ when the Bonferroni correction was used; 2- the SNP is located within a gene selected on the former criteria, and is associated with mortality with a FDR of 5%; 3- the gene, for which we anticipate a functional relevance in sepsis.

Early mortality: The GWAS analysis identified 12 SNPs after Bonferroni correction (Figure 2A, Table 3, Supplementary Table 1). For the identified SNPs, the minor allele was associated with a higher risk of mortality (Table 3). These 12 SNPs correspond to 4 loci on chromosomes 3, 8, 9, and 12. The 3 intragenic SNPs having the strongest evidence of association with early death (Table 3) were located within *CYP11B2:* rs11991278; rs6981918 and rs4544. A strong association was also observed between early death and rs7974468 located within *PTPN11* and rs956727 located in *SLC28A3.* Moreover, 4 other SNPs located within *PTPN11* (rs11066321, rs9668774, rs7975439, and rs12301915) were associated with mortality based on an FDR of 5% (Supplementary Table 1).

Mortality between days 7 and 28: The GWAS analysis identified 16 SNPs after Bonferroni correction (Figure 2B, Table 3, Supplementary Table 2). The 3 intragenic SNPs having the strongest evidence of association with late death (Table 3) were located within *CISH* (rs2239753), *CACNA2D2* (rs12491812) and *MAPKAPK3* (rs12492982). Two other SNPs within *CISH* were also strongly associated (rs2239751 and rs2239752) (Table 3), as was rs7953683 located in *PAWR*. In addition, 6 other SNPs close to *CISH* and located within *DOCK3* or *MAPKAPK3* were associated (Table 3). Moreover, 17 additional SNPs within *PAWR* and 1 SNP within *CACNA2D2* (rs1107312) were associated with mortality based on an FDR of 5% (Supplementary Table 1).

Usefulness of GWAS to predict septic shock outcome

A genetic score was calculated based on the leading SNP at each of the 15 loci among the SNPs that were associated with early mortality after setting up an FDR of 5% (see the Supplementary Table 1). The leader SNPs were rs16857836, rs11991278, rs7974468, rs10849641, rs956727, rs11137198, rs9891869, rs16840396, rs2061815, rs34737153, rs11948550, rs2838103, rs16928895, rs12268257 and rs17169594. The analysis showed that individuals with 4 or more risk alleles had a death risk 12.33-fold higher than those with no risk alleles (adjusted OR= 12.33, 95% CI 5.19-31.82) (Table 4). The cumulative effect of the risk alleles is also represented by ROC curves (Figure 2C). The addition of SNPs significantly improved the AUC obtained with the clinical covariates (0.72 to 0.85; $p=3.15\ 10^{-13}$).

For survival between day 7 and day 28, the leader SNPs were rs359952, rs17442970, rs6692946, rs1509380, rs2239753, rs17072628, rs9856368, rs6852672, rs12654328, rs7726677, rs3797817, rs6910170, rs11987625, rs11994554, rs7840669, rs3005838, rs7096890, rs4575240, rs7953683, rs1882182, rs527603, rs7992136, rs4646220, rs1756650, rs7178141, rs2340518, rs1434590, rs7214197, rs1502522, rs4381690, rs17271418 and rs2232619. The genetic scores were calculated based on the 32 leading SNPs among the SNPs that were associated with late mortality after setting up an FDR of 5% (see the Supplementary Table 2), allowing us to show that individuals with 4 or more risk alleles have a death risk 123.35-fold higher than those with no risk alleles (adjusted OR= 123.353, 95% CI 23.64 - 2292) (Table 4). The cumulative effect of the risk alleles is also represented by ROC curves (Figure 2D). The addition of SNPs significantly improved the AUC obtained with clinical covariates (0.73 to 0.93; $p=9.69\ 10^{-23}$).

Protein-protein networks and functional enrichments

Using the 45 genes containing SNPs associated with early or late mortality or in linkage disequilibrium with those SNPs (Table 5), no functional enrichment was detected (data not shown). The products of those genes were further mapped onto a high quality human protein network. Only the protein products of 30 genes were

mapped, as 15 genes encoded proteins not present in the network (Table 5). Interestingly, 27 out of these 30 proteins encoded by genes associated with mortality are particularly close in the network (average characteristic path length = 3,58 compared to 3,79 for the whole protein network), suggesting a possible involvement in common cellular processes. We therefore extract the subnetwork containing 1617 interactions between 325 proteins (Figure 3A and Supplementary Tables 3), including all the interactors of the 27 proteins. As an example, Figure 3B shows the proteins interacting with PTPN11, CISH, FER, NKCP5, DOCK3, RL6, SYT1, and SNAA/NAPA, the SNPs of which have been associated with early or late death. Furthermore, this subnetwork was significantly enriched for 79 biological pathways with p-values corrected for multiple tests lower than 0.05 (Supplementary Table 4). These pathways included those related to the renin-angiotensin-aldosterone system (aldosterone-regulated sodium reabsorption) and many pathways related to the immune system, which can be clustered into immune signaling pathways ("MAPK signaling pathway", "T cell receptor signaling pathway", "Toll-like receptor signaling pathway", "Natural killer cell mediated cytotoxicity", "NF-kB signaling pathway, "Jak STAT signaling pathway" and "IL6 signaling pathway"). An over-representation of pathways related to cancer (chronic myeloid leukemia; renal cell carcinoma) [22] and brain injuries (neurotrophin signaling pathway)[23] was also found in the subnetwork.

Sepsis-associated SNPs in super-enhancers

We crossed the genomic coordinates of the 139 SNPs with those of enhancer and super-enhancers in 86 tissue or cell types [24]. Figure 4 shows the density of noncoding SNPs associated with mortality in septic shock patients in the super-enhancers and typical enhancers in 12 out of the 86 tissue and cell samples. Also, 13% of these SNPs (18/139) occurred in the super-enhancers of monocytes. This led to a density of 2.91 SNPs per 10 MB, whereas the density of the sepsis-associated SNPs was 0.37 SNPs per 10 MB in typical enhancer of monocytes. We further performed 2 negative controls based on random selection of SNPs and random shuffling of super-enhancers: the density of 139 SNPs randomly chosen was 0.96 SNPs per 10 MB in the super-enhancers of monocytes, whereas the of sepsis-associated SNPs was 0.38 SNPs per 10 MB in the super-enhancers of monocytes that were randomly shuffled in the human genome (Figure 4). Also, sepsis-associated SNPs were overrepresented in the super-enhancers of monocytes ($P=5.9\ 10^{-10}$). Similarly, an enrichment of the sepsis-associated SNPs was found for adrenal gland (P=0.009), Th cells (P=0.002), haematopoietic stem cells ($P=3.5\ 10^{-5}$), and spleen ($P=7.2\ 10^{-8}$) (Figure 4). We further calculated the density of sepsis-associated SNPs in super-enhancers of the other tissue or cell types, including all primary immune cell samples of the catalog. We detected an enrichment for other haematopoietic stem cell samples and for CD4, CD8, and CD56 lymphocytes (data not shown). These enrichments remained significant after taking into account multiple test correction with an FDR of 5%.

Prioritization and annotation of noncoding functional SNPs

We identified 1311 SNPs in strong linkage disequilibrium with the SNPs associated with either early mortality or late mortality (Supplementary Tables 1 and 2), leading to a list of 1450 SNPs (Supplementary Table 5). Since 1439 SNPs were in noncoding regions, we further looked for regulatory SNPs (Supplementary Table 5). Figure 5 shows the outline of SNP annotation and prioritization.

We crossed the genomic coordinates of the 1439 SNPs with those of enhancer and super-enhancers from the catalog published by Hnisz [24]. Among the noncoding SNPs, 505 SNPs were found to be located within enhancers or super-enhancers in at least one of the cell or tissue types. (Supplementary Table 7). Most of the SNPs were located within super-enhancers of monocyte, spleen, or hematopoietic cells. In particular, 150 SNPs were located within enhancers or super-enhancers in CD14+ monocytes. We further searched for transcription factors that may bind to the sequence containing the SNPs associated with mortality or the SNPs in linkage disequilibrium with them. To this aim, we used the ReMap tool, which is a catalog of ChIP-seq results, and RSAT, which analyzes the sequence containing the SNPs and scans a collection of motifs binding transcription factors. We identified 187 SNPs that may alter the binding of transcription factors (Supplementary Table 6). Among them, 31 SNPs were located within enhancers or super-enhancers, on the basis of the catalog published by Hsniz et al. [24], whereas 16 SNPs were annotated as eQTLs (Supplementary Table 7). Among the 16 SNPs, 14 SNPs were located within 2 super-enhancers located within either the *RNF135* gene locus or the *CISH* and *MAPKAPK3* gene locus. Interestingly, rs2170840 and rs616689 within the *CISH* and *MAPKAPK3* gene locus were associated with late mortality with a P value lower than 10^{-8} (Table 3).

In parallel, we ranked the SNPs associated with mortality and the SNPs in linkage disequilibrium with them with two bioinformatic tools, named TAGOOS[57] and IW-scoring[58]. Each tool gives a score based on genomic and epigenomic annotations to predict the regulatory effect of the SNPs. Figure 6 shows the results of the ranking of the SNPs on the basis of the IW-score. The details are in Supplementary Table 8. Among the SNPs associated with mortality or the SNPs in linkage disequilibrium with them, the SNP with the highest IW-score was rs143356980, which is located close to rs2170840 and rs616689 within the *CISH* and *MAPKAPK3* gene locus on the chromosome 3. Noticeably, rs2170840 and rs616689 were ranked in 143th and 23th position by using the IW-scoring method, respectively. rs143356980 was ranked in 13^{th} position on the basis of the intergenic TAGOOS score, whereas it had the best score among the SNPs within chromosome 3. rs2170840 and rs616689 were ranked in 99th and 64th position on the basis of the intergenic TAGOOS score, respectively.

Interestingly, rs143356980 was located within a super-enhancer of CD14+, CD4+, CD8+, CD34+, and spleen cells (Supplementary Table 7), and was in linkage disequilibrium with eQTLs, including rs2170840 and rs616689. Moreover, rs143356980 was in linkage disequilibrium (r^2>0.55) with 13 out of the 14 SNPs associated with late mortality and located within the *CISH* and *MAPKAPK3* gene locus (Supplementary Table 2). rs143356980 was in strong linkage disequilibrium (r^2>0.80) with 4 SNPs associated with late mortality: rs2239751, rs2239751, rs12492982, and rs17051403 (Table 3).

Figure 7 shows a detailed view of the *CISH* and *MAPKAPK3* gene locus, which contains 14 SNPs associated with late mortality with an FDR of 5% and SNPs in linkage disequilibrium with them. These include rs143356980, which is located within a peak of H3K4me1, a peak of H3K27ac histone mark, a DNAse I hypersensitivity site, and a region binding to several transcription factors. Furthermore, rs143356980 is located within GH03J050580 from the GeneHancer catalog, and a super-enhancer of monocytes from the catalog by Hnisz et al. [24].

Experimental validation of the regulatory effect of rs143356980

We generated $K562^{-/-}$ cells, in which 1636 bp genomic region around rs143356980 was deleted using CRISPR/Cas9 system (Figure 7). Three independent clones were used to measure the expression of *CISH* and compare it with that of non-deleted K562 cells. Figure 7 shows the sequence of the region around rs143356980 in 1B1, 1B2, and 5C clones. Noticeably, the deleted region was the expected 1636 bp genomic region for 1B1 and 5C clones, whereas that of 1B2 clone was slightly smaller (Figure 7). Quantitative real-time PCR assays showed a significant downregulation of *CISH* transcripts in $K562^{-/-}$ cells (n=27) versus non-deleted K562 cells (n=9) with (t=7.90, P<0.001) and without stimulation by IFNγ. (t=7.74, P<0.001); these differences remained significant when taking into account the clustering of triplicates into three experiments for K562 and each $K562^{-/-}$ clone (P=0.004 for unstimulated cells, P=0.007 for cells stimulated by IFNγ.), as shown in Figure 8A. Similarly, another series of experiments showed a downregulation *of CISH* in $K562^{-/-}$ cells (n=27) versus non-deleted K562 cells (n=9) with (P=0.008) and without stimulation by LPS (P=0.011), when taking into account the experiment factor (Figure 8B). In addition, after grouping the series of experiments performed with unstimulated cells, the analysis confirmed the effect of the deletion on *CISH* expression (P<0.001).

When analyzing each clone, *CISH* expression was lower in 1B1 (n=9), 1B2 (n=9), and 5C (n=9) clones than that of non-deleted K562 cells (n=9) on the basis of a Student's t test (t > 4.37, P<0.001). When taking into account the clustering of triplicates into three experiments, the downregulation of *CISH* remained significant in

1B1 (P=0.01 for unstimulated cells, P=0.001 for cells stimulated by IFNγ.) and 1B2 (P=0.001 for unstimulated cells, P=0.037 for cells stimulated by gamma IGN) clones versus nondeleted K562 cells (Figure 8A), whereas it was not significant for 5C clone (P=0.054 for unstimulated cells, P=0.114 for cells stimulated by IFNγ.). Another series of experiments confirmed this result in unstimulated 1B1 (P<0.001), 1B2 (P=0.003), and 5C clones (P=0.075) (Figure 8B), and provided evidence of a down regulation of *CISH* in cells stimulated by LPS (P=0.006 for 1B1, P=0.010 for 1B2, P=0.028 for 5C). The downregulation of *CISH* in unstimulated 5C clone was significant when grouping all the experiments (P=0.006), whereas it was highly significant for 1B1 (P<0.001) and 1B2 (P<0.001).

We further cloned upstream a 607 bp region surrounding rs143356980 into a luciferase reporter vectors to test its regulatory effect (Figure 9). The enhancer activity of the region surrounding rs143356980 was detected in cells with the minimal promoter (t>8.9, P<0.001) and cells with the *CISH* promoter (t>2.7, P<0.016), as shown in Figure 9. This was further confirmed, when taking into account both the experiment factor and rs143356980 allele for the minimal promoter and the *CISH* promoter (P<0.001). Nevertheless, the results showed a clear effect of rs143356980 on the enhancer activity. Also, the luciferase activity in K562 cells with both the *CISH* promoter and the enhancer with rs143356980-C allele was significantly higher than that in K562 cells with both the *CISH* promoter and the enhancer with rs143356980-T allele (P=0.004 for unstimulated cells and P<0.001 for cells stimulated with IFNγ.), after taking into account the clustering of triplicates into three experiments. Similar results were obtained in K562 cells with the minimal promoter (P=0.023 for unstimulated cells and P=0.010 for cells stimulated with IFNγ.). Interestingly, there was no effect of IFNγ on the luciferase activity in K562 cells with the minimal promoter (Figure 9). In contrast, the luciferase activity in K562 cells with the *CISH* promoter was higher in cells stimulated with IFNγ than that in unstimulated cells (P<0.003), indicating that IFNγ acts on the *CISH* promoter.

Discussion

In this study, we assessed the association of SNPs with early and late mortality in septic shock patients at the genome level, and we looked for biological pathways that could be disrupted by genetic variation. We then annotated and prioritized the SNPs associated with mortality and the SNPs in linkage disequilibrium with them and characterized the functional significance of the best candidate.

This present GWAS follows a previous study using the same PROWESS cohort[19] but was designed following the removal of aPC from the market due to the absence of a benefit for this drug in the PROWESS SHOCK study. We exclusively targeted a septic shock population, a selection that differs from the previous GWAS[19].

Furthermore, we grouped the data from the placebo and the treated arms, and considered the treatment with aPC as a covariate. The growing evidence for potential differing mechanisms for early versus late death[20,21] was then considered to test SNP associations. The early stimulation of inflammation processes appears to be rapidly followed by a downregulation of these processes through dominant anti-inflammatory patterns, which can be considered to be adapted to keep the patient alive but is risky if it persists over time in cases with a high risk of secondary infection[25]. The present GWAS brings important insights to studies of human septic shock mechanisms. At the early phase of septic shock, both clinical variables and systemic inflammation intensity (plasma levels of IL-6) were associated with early death. For late death, co-morbidities, age and SOFA score levels influenced the crude mortality related to septic shock[10]. Moreover, aPC treatment was associated with a reduced risk of late death, suggesting a protective effect. Also, the association of aPC treatment with mortality could be re-assessed in other datasets with a focus on late death.

Based on a FDR of 5%, 32 and 108 SNPs were associated with early and late mortality, respectively. These associations reduced to 12 and 16 SNPs after the Bonferroni correction for early and late mortality, respectively. Individuals having 4 or more risk alleles had a 12-fold higher or a 123-fold higher risk of death than those without risk alleles for early and late death, respectively. For early death, the strongest associations between intra-genic SNPs were located within *CYP11B2*, a gene encoding aldosterone synthase, a key enzyme of the aldosterone biosynthesis. Variants of such a gene have never been reported to be associated with human shock status and/or severe infection, but have been shown to be largely associated with hypertension and atrial fibrillation[26]. The other important SNPs associated with early mortality were located within *PTPN11,* which is also known as *SHP2*. The proteins encoded by this gene are members of the protein tyrosine phosphatase (PTP) family that are known to be signaling molecules regulating a variety of cellular processes. This PTP family contains two *tandem Src homology-2 domains*, which function as phospho-tyrosine binding domains and mediate the interaction of this PTP with its substrates. The protein encoded by *PTPN11* is implicated in reduced JAK/STAT signaling when it is elevated, which may reduce MHC expression induced by INFγ [22]. SHP2 activation induced by human CMV infection is responsible for the down-regulation of INFγ-induced STAT1 tyrosine phosphorylation.[27] In addition, the PD1/PDL1 interaction has been shown to inhibit T cell receptor signaling by recruiting SHP1/2 phosphatases[28]. For late mortality, it should be noticed that *FER* reported to be associated with mortality in sepsis caused by pneumonia [17] was associated with mortality in septic patients in our study on the basis of an FDR of 5%. FER that is a protein tyrosine kinase acting downstream of cell-surface receptors has been shown to influence leucocyte recruitment in response to LPS (PMID 11994443), to inhibit neutrophil chemotaxis (PMID 23355730), and to

endothelial response to LPS stimulation (PMID 31475010). Furthermore, the strongest associations were found within cytokine-inducible SRC homology 2 (SH2) domain protein (*CISH*) and *MAPKAPK3*. *MAPKAPK3* is involved in the MAP Kinase pathway, a pathway known to regulate the activation of immune cells. *CISH* is the first member of the SOCS family. An association has been shown between *CISH* polymorphisms and susceptibility to infectious diseases including malaria, bacteremia or tuberculosis[29]. In addition, rs414171-T allele that was associated with susceptibility to bacteremia, tuberculosis and malaria has been shown to reduce the promoter activity of *CISH* and its expression in human PBMCs after stimulation by IL-2 [29]. Since CISH is known to suppress STAT5 in T cells, it has been proposed that decreased levels of *CISH* lead to enhanced activation of STAT5 and enhanced activation of Treg lymphocytes, and as a consequence a suppressed immune response against bacteria and other pathogens.

Noticeably, the *CISH* locus was highlighted by our bioinformatic analyses, which aimed to annotated and prioritize SNPs associated with mortality and the SNP in linkage disequilibrium with them. Since more than 95% of the SNPs associated with mortality or the SNPs in linkage disequilibrium with them were located in non-coding regions, we hypothesized that the vast majority of the causal genetic variants are regulatory variants. More generally, most of the GWAS variants are non-coding, emphasizing the potential role of regulatory variants in complex diseases [30,31]. Also, we investigated 1439 non-coding SNPs including SNPs associated with mortality and SNPs in linkage disequilibrium with them. Among those SNPs, rs143356980 was the best candidate using the IW-scoring method and was ranked in 13th position on the basis of the intergenic TAGOOS score. Interestingly, it is located near the *CISH* gene, and is in strong linkage disequilibrium with 4 SNPs highly associated with late mortality in patients with septic shock; these includes rs2239751, which has been also associated with tuberculosis [32,33], and persistent hepatitis B virus infection [34]. Furthermore, rs143356980 is located within a super-enhancer for monocytes and T lymphocytes, according to the database by Hnisz et al. [24]. Using the CRISPR-Cas9 genome editing method, we showed that the sequence containing rs143356980 has an enhancer activity on the *CISH* gene in unstimulated K562 cells and K562 cells stimulated with either LPS or IFNγ. Using the luciferase reporter assay, we showed the effect of rs143356980 on the enhancer activity in unstimulated K562 cells and K562 cells stimulated with IFNγ. More specifically, rs143356980-T decreased the enhancer activity compared to rs143356980-C allele. In all, these results suggest that genetic variation within the enhancer containing rs143356980 influences *CISH* gene expression, Jak/Stat signal transduction, and the risk of death in septic shock patients. It is not excluded, nevertheless, that other SNPs within the same enhancer or other regulatory regions alter *CISH* gene expression and susceptibility to sepsis. These include rs414171, which has been shown to reduce *CISH* expression in human PBMCs after

stimulation by IL-2 [29]. rs143356980 and other genetic variants in an enhancer may act through the same mechanisms, leading to susceptibility to sepsis.

Since the expression of *CISH* is induced through the stimulation of other receptors, genetic variation altering *CISH* expression may have functional consequences in other cells. *CISH* expression is induced in response to EPO, IL-2, IL-3, IL-5, GM-CSF in hematopoeitic cells, leading mostly to the activation of STAT5 [35,36]. In addition, *CISH* is an inducible gene in NK cells stimulated by IL-15, and deletion of *CISH* increased proliferation, IFNγ production and cytotoxicity against tumors [37]. Since NK cells in septic patients have been shown to produce low levels of IFNγ and to have a decreased cytotoxicity activity [38], low levels of *CISH* may influence susceptibility to sepsis through an NK cell dependent mechanism. *GM-CSF* expression is induced in macrophages infected by M. tuberculosis, leading to *CISH* expression and an increased replication of M. tuberculosis [39]. Moreover, LPS and IFNγ induce the expression of *CISH* in human monocytes, as shown in a transcriptomic study [40]. Similarly, we report in the present study an increase of the *CISH* expression in K562 cells stimulated by either LPS and IFNγ. Nevertheless, the functional effect of *CISH* expression levels remains to be investigated in monocytes or macrophages in septic patients.

Forty-five genes that encode proteins contained the SNPs associated with early or late mortality or the SNPs in linkage disequilibrium with the SNPs. Enrichment in biological pathways (KEGG and BIOCARTA) was used to investigate the involved underlying biological functions. Since no significant enrichment based on the 45 genes was found, we mapped the proteins encoded by these 45 genes on a high quality protein-protein network[41]. Thirty proteins out of the 45 proteins were included in the whole protein-protein network, leading to identify a sub-network that contains 27 proteins associated with mortality and their 298 direct interactors. Interestingly, each of these proteins shared at least one common interactor with another protein associated with mortality. For example, CISH and PTPN11 shared five direct interactors, whereas CISH and FER shared one interactor. This suggests that genetic variants altering the function or the expression of proteins belonging to the sub-network may act in combination to influence mortality in septic shock patients. Furthermore, this subnetwork was enriched for 79 significant pathways, including Toll-like receptor, IL-6, Jak-STAT, and T cell receptor signaling pathways as well as aldosterone-regulated sodium reabsorption. Thus, the dysregulation of the renin-angiotensin-aldosterone system and the dysregulation of the monocyte/macrophage activation or the T-cell activation may be involved in sepsis-induced associated organ failure. In the same way, sepsis-associated SNPs were enriched in the super-enhancers of adrenal gland that produces aldosterone; furthermore, sepsis-associated SNPs were highly enriched in the super-enhancers of monocytes and Th lymphocytes. Moreover, Davenport et al. recently reported that patients with higher early mortality had an increased expression of negative regulators of TLR signaling,

and a down-regulation of human leucocyte antigen class II genes and most genes implicated in T cell activation[42]. The clinical relevance of these findings is strongly supported by the significant benefits of associating clinical traits with SNPs to predict early and late death (Figure 2 C, D).

Our results suggest that genetic variations in different genes including *CISH* alter the activation of immune cells and, in turn, increase the risk of both early and late mortality in patients with septic shock. It is, nevertheless, important to point out the limitations of the study. First, a number of SNPs have not yet been genotyped, justifying our investigation on genes in linkage disequilibrium; second, the observed results associating significant SNPs and mortality have not yet been replicated. To reduce the impact of these limitations and to provide greater homogeneity, only Caucasian patients with septic shock were selected; this allowed us to look for SNP in strong linkage disequilibrium with SNPs associated with mortality. In addition, we investigated the potential functional significance of the identified SNPs using protein-protein interactions and bioinformatics tools predicting regulatory SNPs. Finally, we performed experimental studies to validate the regulatory effect of a candidate SNP.

In conclusion, this GWAS analysis identified new loci for mortality in patients with septic shock. Here, we provide evidence for i) different covariates that influence early or late mortality, supporting the concept to separate early and late mortality; ii) SNPs associated either with early or with late mortality; iii) a protein-protein sub-network highlighting relevant biological pathways, such as the Jak/stat pathway; iv) the combination of relevant clinical traits and relevant SNPs that may better predict early and late mortality; v) a regulatory effect of a sequence containing candidate SNPs on *CISH* expression, and an effect of rs143356980 on the enhancer activity.

Methods

Patients, database, and study design

The flow chart of the study shown in Figure 1 is also shown in Supplementary Figure 1, providing all steps and reasons for the final size of the cohort used for GWAS. The studied cohort was kindly provided through a formal contract between Eli Lilly and Co. (Eli Lilly and Co.; Indianapolis USA), the owner of the PROWESS database and the senior author of the study (DP). The RCT PROWESS was a multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study evaluating the efficacy of activated protein C (aPC) in severe sepsis. The ethical committees for each study center approved the original trial protocol and written consent was obtained from all participants or their authorized representatives. The DNA collection was included in the trial with the intent of testing for factor V polymorphisms, and consultation with Bioethics committees determined that no additional consent was necessary for

further genetic studies on unidentified samples. The entry criteria and clinical phenotyping for the PROWESS study have previously been reported [43].

The recent report of the RCT PROWESS SHOCK [5] showed that aPC treatment did not improve outcome in septic shock patients in comparison with the placebo group. This allowed us to further investigate the PROWESS database, selecting exclusively septic shock patients, and pooling placebo and treated individuals. aPC treatment was, nevertheless, included as a covariate and was tested for the studied phenotypes.

The clinical characteristics, co-morbidity presence and day 1 plasma IL-6 levels as a marker of systemic inflammation[44] were collected (Table 1). Because different mechanisms may drive early mortality compared to late mortality (after 7 days)[21,45], the association with outcome was separated into early (before day 7) and late (between day 7 - day 28) death.

Cell line and culture conditions

The chronic myelogenous leukemia cell line K562 (CCL-243) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in RPMI (Gibco) supplemented with 20% FBS (Gold, PAA) at 37 °C and 5% CO_2. For cell stimulation, 10^6 K562 cells were incubated with IFN-ɣ (Miltenyi, 130-096-484) at 100 ng/ml for 6 h or LPS (sigma L9143) at 100 ng/ml for 24h.

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) selection

Briefly, genomic DNAs were pre-amplified using a GenomePlex whole genome amplification kit from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). An Illumina Human 1M-Duo BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) was used for genotyping as previously reported[19]. Thus, 1,199,187 SNPs were genotyped for each individual. The SNPs were selected according to minor allelic frequencies, call rates and Hardy-Weinberg equilibrium. As a first step for quality control, we applied "check.marker" based method implemented in the R package GenABEL [46] to assess the call rate for the SNPs. The SNPs with minor allele frequencies below 1% and genotyping rates below 95% were removed from the dataset, resulting in 948,573 SNPs. The individuals with a call rate below 95% were excluded from the analyses, resulting in 1,411 individuals (Figure 1 and Supplementary Figure 1). The individuals were further selected on the basis of a population stratification analysis. First, a multidimensional scaling using Euclidean distances (principal component analysis) was applied using the cmdscale method implemented in the “stats” package[47]. Second, the “kmean” partitioning algorithm (R stats package) was used [47]. This

resulted in three clusters, the largest one bringing together essentially CEU individuals. The two other clusters were composed of 122 and 113 individuals, respectively. Thus, 1,176 individuals comprising the largest cluster were kept for further analysis (Supplementary Figure 1). A departure from Hardy-Weinberg expectation was assessed and deviating SNPs were excluded, resulting in 896,358 SNPs. The genotype rate was then re-evaluated, and individuals displaying more than 5% of the missing genotypes were excluded, resulting in 1,173 individuals. Within this cohort, only patients who underwent septic shock were selected for the association analyses (n=832) (Figure 1 and Supplementary Figure 1).

Association analyses and statistical methods

The clinical characteristics, presence of co-morbidities and levels of IL-6 in the plasma (taken as a marker of systemic inflammation) [44] were recorded (Table 1). The plasma levels of IL-6 measured at day 1 were expressed in logarithm base 10 due to scattered values. The organ components of the SOFA score were provided by the PROWESS dataset. Table 1 shows statistics for all the Caucasian patients with septic shock, and for the deceased and surviving patients before and after 7 days. A logistic regression analysis was performed to assess the association of (i) early or (ii) late mortality with covariates (Table 2), using the glm function from the R software. Covariates with p-values below or equal to 0.2 were selected by univariate analysis and further included in the multivariate logistic regression model. The best model was chosen on the basis of the Akaike Information Criterion in a backward and forward stepwise procedure [48]. Only covariates having a p-value below or equal to 0.05 in the model were used for the genetic association analyses (Table 2). The significant covariates were taken into account in further analyses.

The GenAbel package[46] was used for the GWAS, assuming an additive mode of inheritance. It allowed us to perform analyses with adjustment for covariates. The score test in the “qtscore” function of GenABEL was applied, and yielded a p-value for each SNP, after correcting for the inflation factor lambda. The Bonferroni correction and False Discovery Rate (FDR) procedure were used to correct for multiple tests in each association study. The nominal p-value corresponding to a genome-wide risk of 5% was 5.58×10^{-8} on the basis of the Bonferroni correction. In addition, we used the FDR method that controls the expected proportion of false positives among associations considered significant. To this aim, we used the qvalue R library with a threshold set to 5%[46]. The Manhattan plots for GWAS results were obtained using the GenABEL R library; Manhattan plots show -log10 of the p-values along all autosomes (Figures 2A and 2B). Finally, odds ratios and 95% confidence intervals were calculated using the “glm” function in R for each significant SNP and for the SNP groups. The adjusted odds ratios that take into account the effect of the

covariates were calculated on this basis. The unadjusted odds ratios were also calculated without including the covariates in the logistic regression model.

We used the *Haploreg* database to identify the SNPs in linkage disequilibrium with the SNPs associated with mortality[49]. The linkage calculation was based on the 1000 genome project data restricted to Euroepean individuals and the SNPs with r^2>0.8 and d'>|0.89| were identified. This led to a determination of the chromosomal region that likely contains the causal SNP.

The Receiver Operating Characteristic (ROC) curves of a logistic regression model were plotted using the epicalc R package. For the genetic part, the leader SNP of each associated locus (the SNP with the lowest q-value for each locus) was included in the logistic regression model. The significance of the difference between the ROC curves was assessed by the likelihood ratio test.

Student's t test was used to assess on the one hand the effect of CRISPR-Cas9-mediated deletion of enhancer on *CISH* expression in K562 cells, and on the other hand that of rs143356980 on reporter gene expression in K562 cells. For each type of cells (non-deleted or deleted K562 cells) and each condition, three experiments were performed with triplicates. Also, mixed linear models were further used to take into account the triplicates within each of the three experiments.

Protein-protein network and functional enrichment

The products of the genes associated with the two phenotypes were mapped on a high quality human interactome network containing 74,388 binary protein-protein interactions between 12,865 proteins[41]. Their first neighbors in the network and their interactions were subsequently retrieved. Then, we searched for a subnetwork based on the interaction between proteins associated with mortality and their direct interactors. The associated proteins separated by more than one interactor were removed. The functional annotation was performed using the DAVID web tool[50], and the entire interactome was used as a background. The significance was computed for each term of the KEGG[51] and BIOCARTA pathways[52].

SNP annotation and prioritization

SNPs in linkage disequilibrium with SNPs associated with early or late death were identified with haploregV4 [53]; a threshold of $r^2 \geq 0.8$ was used in the CEU population. ReMap and RSAT were employed to evaluate the effective transcription factor binding to the sequence containing the SNP. ReMap integrates the results of

transcriptional regulators ChIP-seq experiments from both Public and Encode datasets [54]. ReMap allowed us to cross our genomic regions against the ReMap catalog of transcription factor binding peaks. Regulatory Sequence Analysis Tool (RSAT) was used to explore the sequences containing the SNPs of interest [55]. Variation-scan that is a RSAT tool was used to assess the potential effect of the SNP on transcription factor binding and to identify motifs that may be affected by the SNP. A catalog of super-enhancers in a broad range of human cell types was used to identify cells or tissues, for which super-enhancers contained SNPs of interest [24]. The SNipa database was used to look for eQTLs [56].

To prioritize all the candidate noncoding SNPs, integrative bioinformatics approaches was used. TAGOOS that uses a supervised machine-learning algorithm was employed to classify the potential regulatory SNPs on the basis of a broad range of annotations such as epigenomic marks or eQTLs [57]. IW-scoring that integrates scores from 11 tools was also used to prioritize the candidate SNPs [58]

Genome editing using the CRISPR-Cas9 method

Two gRNAs were designed for each end of the targeted region using the CRISPRdirect tool [59], as shown in Figure 7. The gRNAs were cloned into a gRNA cloning vector (Addgene, 41824) as previously described [60]. The sequences of the forward gRNA and reverse gRNA were CCTCATCAGATAACCTCCAG and ATAGCCCTCAGAGGCCCTGC, respectively. One million cells were transfected with 1 µg of the hCas9 vector (Addgene, 41815) and 1 µg of each gRNA using the Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific). Three days after transfection, transfected cells were plated in 96-well plates at limiting dilution (0.5 cells per 100 µl per well) for clonal expansion. individual cell clones were screened for homologous allele deletion by direct PCR using Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacture's protocol. Forward and reverse primers were designed bracketing the targeted regions to detect deleted and non-deleted clones: GGCTCATTCCCTTGGTCCAG for the forward primer and GCCACTCTCCAACCACTCTG for the reverse primer. Sequencing based on the Sanger method was used to check successful deletion of the sequence of interest.

cDNA synthesis and qRT-PCR.

Total RNA was extracted using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). 500 ng of RNA was reverse transcribed into cDNA using Superscript VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR was performed using Power SYBR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) on a QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System apparatus.

Forward and reverse primer sequences were AGAGAGTGAGCCAAAGGTGC and TCTTCTGCAGGTGTTGTCGG, respectively. Gene expression was normalized to that of *GAPDH,* as an endogeneous control. Relative expression was calculated by the $\Delta\Delta C_T$ method, and all data shown were reported as a fold change over the control.

Gene reporter assays

CISH promoter sequence and the genomic region flanking rs143356980 was amplified from human genomic DNA. Three constructions were cloned into PGL3 vector. First, *CISH* promoter sequence (1573pb) was cloned upstream of the luciferase gene at the MluI–XhoI sites in pGL3-basic vector. Second, *CISH* enhancer sequence (619pb) containing rs143356980 was cloned in pGL3-promoter at the BamHI-SalI site. Third, *CISH* promoter and *CISH* enhancer sequence (619pb) containing rs143356980 were cloned in the previous places in the pGL3-basic vector. Site directed mutagenesis was used to generate the rs143356980 mutation C -> T with the Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB). A total of 1×10^6 K562 cells were cotransfected with 1 µg of each tested construct and 200 ng of *Renilla* vector using the Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific). Electroporation conditions for K562 cells are described in the CRISPR–Cas9 genome editing section. Six hours after transfection, luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay kit (Promega) on a Victor Nivp (PerkinElmer). For all measurements, firefly luciferase values were first normalized to *Renilla* luciferase values (controlling for transfection efficiency and cell number). Data are represented as the fold increase in relative luciferase signal over the pGL3-Promoter vector.

Data availability

Detailed statistics results and protein-protein interaction data are available from the corresponding author upon request.

References

1 Stevenson, E. K., Rubenstein, A. R., Radin, G. T., Wiener, R. S. & Walkey, A. J. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. *Critical care medicine* **42**, 625-631, doi:10.1097/CCM.0000000000000026 (2014).

2 Levy, M. M. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Critical care medicine* **43**, 3-12, doi:10.1097/CCM.0000000000000723 (2015).

3 Sprung, C. L. *et al.* Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* **358**, 111-124, doi:10.1056/NEJMoa071366 (2008).

4 Valenta, J., Brodska, H., Drabek, T., Hendl, J. & Kazda, A. High-dose selenium substitution in sepsis: a prospective randomized clinical trial. *Intensive care medicine* **37**, 808-815, doi:10.1007/s00134-011-2153-0 (2011).

5 Ranieri, V. M. *et al.* Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *The New England journal of medicine* **366**, 2055-2064, doi:10.1056/NEJMoa1202290 (2012).

6 Caironi, P. *et al.* Albumin replacement in patients with severe sepsis or septic shock. *N Engl J Med* **370**, 1412-1421, doi:10.1056/NEJMoa1305727 (2014).

7 Boomer, J. S. *et al.* Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* **306**, 2594-2605, doi:10.1001/jama.2011.1829 (2011).

8 Esper, A. M. *et al.* The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Critical care medicine* **34**, 2576-2582, doi:10.1097/01.CCM.0000239114.50519.0E (2006).

9 Cohen, J., Opal, S. & Calandra, T. Sepsis studies need new direction. *Lancet Infect Dis* **12**, 503-505, doi:10.1016/S1473-3099(12)70136-6 (2012).

10 Wenzel, R. P. & Edmond, M. B. Septic shock--evaluating another failed treatment. *N Engl J Med* **366**, 2122-2124, doi:10.1056/NEJMe1203412 (2012).

11 Mira, J. P. *et al.* Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *Jama* **282**, 561-568 (1999).

12 Lowe, P. R., Galley, H. F., Abdel-Fattah, A. & Webster, N. R. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Critical care medicine* **31**, 34-38, doi:10.1097/01.CCM.0000038211.80952.F3 (2003).

13 Clark, M. F. & Baudouin, S. V. A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Intensive care medicine* **32**, 1706-1712, doi:10.1007/s00134-006-0327-y (2006).

14 Manolio, T. A. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* **363**, 166-176, doi:10.1056/NEJMra0905980 (2010).

15 Davila, S. *et al.* Genome-wide association study identifies variants in the CFH region associated with host susceptibility to meningococcal disease. *Nature genetics* **42**, 772-776, doi:10.1038/ng.640 (2010).

16 Timmann, C. *et al.* Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. *Nature* **489**, 443-446, doi:10.1038/nature11334 (2012).

17 Rautanen, A. *et al.* Genome-wide association study of survival from sepsis due to pneumonia: an observational cohort study. *Lancet Respir Med* **3**, 53-60, doi:10.1016/S2213-2600(14)70290-5

S2213-2600(14)70290-5 [pii] (2015).

18 Flores, C. Host genetics shapes adult sepsis survival. *Lancet Respir Med* **3**, 7-8, doi:10.1016/S2213-2600(14)70307-8 (2015).

19 Man, M. *et al.* Beyond single-marker analyses: mining whole genome scans for insights into treatment responses in severe sepsis. *The pharmacogenomics journal* **13**, 218-226, doi:10.1038/tpj.2012.1 (2013).

20 Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet. Infectious diseases* **13**, 260-268, doi:10.1016/S1473-3099(13)70001-X (2013).

21 Riche, F. *et al.* Reversal of neutrophil-to-lymphocyte count ratio in early versus late death from septic shock. *Crit Care* **19**, 439, doi:10.1186/s13054-015-1144-x (2015).

22 Liu, X. *et al.* Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN-gamma can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. *J Immunol* **181**, 449-463 (2008).

23 Pellegrino, M. J. & Habecker, B. A. STAT3 integrates cytokine and neurotrophin signals to promote sympathetic axon regeneration. *Mol Cell Neurosci* **56**, 272-282, doi:10.1016/j.mcn.2013.06.005 (2013).

24 Hnisz, D. *et al.* Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* **155**, 934-947, doi:10.1016/j.cell.2013.09.053 (2013).

25 Lukaszewicz, A. C. *et al.* Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Critical care medicine* **37**, 2746-2752, doi:10.1097/CCM.0b013e3181ab858a (2009).

26 Bress, A. *et al.* Association of aldosterone synthase polymorphism (CYP11B2 -344T>C) and genetic ancestry with atrial fibrillation and serum aldosterone in African Americans with heart failure. *PloS one* **8**, e71268, doi:10.1371/journal.pone.0071268 (2013).

27 Baron, M. & Davignon, J. L. Inhibition of IFN-gamma-induced STAT1 tyrosine phosphorylation by human CMV is mediated by SHP2. *J Immunol* **181**, 5530-5536 (2008).

28 Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* **173**, 945-954 (2004).

29 Khor, C. C. *et al.* CISH and susceptibility to infectious diseases. *The New England journal of medicine* **362**, 2092-2101, doi:10.1056/NEJMoa0905606 (2010).

30 Hindorff, L. A. *et al.* Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9362-9367, doi:10.1073/pnas.0903103106 (2009).

31 Nicolae, D. L. *et al.* Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS Genet* **6**, e1000888, doi:10.1371/journal.pgen.1000888 (2010).

32 Ji, L. D. *et al.* Polymorphisms in the CISH gene are associated with susceptibility to tuberculosis in the Chinese Han population. *Infect Genet Evol* **28**, 240-244, doi:10.1016/j.meegid.2014.10.006 (2014).

33 Zhao, L. *et al.* Association between single-nucleotide polymorphism in CISH gene and susceptibility to tuberculosis in Chinese Han population. *Cell Biochem Biophys* **68**, 529-534, doi:10.1007/s12013-013-9733-2 (2014).

34 Hu, Z. *et al.* Polymorphisms in CISH gene are associated with persistent hepatitis B virus infection in Han Chinese population. *PloS one* **9**, e100826, doi:10.1371/journal.pone.0100826 (2014).

35 Matsumoto, A. *et al.* CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* **89**, 3148-3154 (1997).

36 Yoshimura, A. *et al.* A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J* **14**, 2816-2826 (1995).

37 Delconte, R. B. *et al.* CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. *Nat Immunol* **17**, 816-824, doi:10.1038/ni.3470 (2016).

38 Feng, T. *et al.* A shift toward inhibitory receptors and impaired effector functions on NK cells contribute to immunosuppression during sepsis. *J Leukoc Biol*, doi:10.1002/JLB.4A0818-313RR (2019).

39 Queval, C. J. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. *Cell Rep* **20**, 3188-3198, doi:10.1016/j.celrep.2017.08.101 (2017).

40 Fairfax, B. P. *et al.* Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression. *Science* **343**, 1246949, doi:10.1126/science.1246949 (2014).

41 Chapple, C. E. *et al.* Extreme multifunctional proteins identified from a human protein interaction network. *Nat Commun* **6**, 7412, doi:10.1038/ncomms8412 (2015).

42 Davenport, E. E. *et al.* Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med* **4**, 259-271, doi:10.1016/S2213-2600(16)00046-1 (2016).

43 Bernard, G. R. *et al.* Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *The New England journal of medicine* **344**, 699-709, doi:10.1056/NEJM200103083441001 (2001).

44 Bozza, F. A. *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* **11**, R49, doi:10.1186/cc5783 (2007).

45 Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* **13**, 862-874, doi:10.1038/nri3552 (2013).

46 Aulchenko, Y. S., Ripke, S., Isaacs, A. & van Duijn, C. M. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics* **23**, 1294-1296, doi:10.1093/bioinformatics/btm108 (2007).

47 (ed Austria R for Statistical Computing. Vienna) (ISBN 3-900051-07-0, URL. R-project.org/. 2013).

48 Ripley, W. N. V. a. B. D. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth edn, (Springer, 2002).

49 Ward, L. D. & Kellis, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic acids research* **40**, D930-934, doi:10.1093/nar/gkr917 (2012).

50 Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* **37**, 1-13, doi:10.1093/nar/gkn923 (2009).

51 Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* **28**, 27-30 (2000).

52 Nishimura, D. BioCarta. *Biotech Software & Internet Report* **2**, 117-120 (2001).

53 Ward, L. D. & Kellis, M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic acids research* **44**, D877-881, doi:10.1093/nar/gkv1340 (2016).

54 Cheneby, J., Gheorghe, M., Artufel, M., Mathelier, A. & Ballester, B. ReMap 2018: an updated atlas of regulatory regions from an integrative analysis of DNA-binding ChIP-seq experiments. *Nucleic acids research* **46**, D267-D275, doi:10.1093/nar/gkx1092 (2018).

55 Nguyen, N. T. T. *et al.* RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. *Nucleic acids research* **46**, W209-W214, doi:10.1093/nar/gky317 (2018).

56 Arnold, M., Raffler, J., Pfeufer, A., Suhre, K. & Kastenmuller, G. SNiPA: an interactive, genetic variant-centered annotation browser. *Bioinformatics* **31**, 1334-1336, doi:10.1093/bioinformatics/btu779 (2015).

57 Gonzalez, A., Artufel, M. & Rihet, P. TAGOOS: genome-wide supervised learning of non-coding loci associated to complex phenotypes. *Nucleic acids research* **47**, e79, doi:10.1093/nar/gkz320 (2019).

58 Wang, J., Dayem Ullah, A. Z. & Chelala, C. IW-Scoring: an Integrative Weighted Scoring framework for annotating and prioritizing genetic variations in the noncoding genome. *Nucleic acids research* **46**, e47, doi:10.1093/nar/gky057 (2018).

59 Naito, Y., Hino, K., Bono, H. & Ui-Tei, K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* **31**, 1120-1123, doi:10.1093/bioinformatics/btu743 (2015).

60 Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823-826, doi:10.1126/science.1232033 (2013).

Acknowledgments.

The authors thank the Lilly Company leaders in charge of the PROWESS trial who graciously allowed us to use the GWAS database: Jonathan Janes, M.B., B.Ch. and William L. Macias, M.D., Ph.D. We thank the centers for having enrolled the patients in the PROWESS trial, the field nurses and the field workers for organizing the data and assisting with the sample collection, and all of the participants in the study. This work was supported by grants from the University Paris 7, the French Ministry of Research, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Aix-Marseille University, as well as by the Eli Lilly full grant for genome-wide research performed on DNA samples from PROWESS Randomized Control Trial. AB was supported by a PhD fellowship from the French Ministry and by a fellowship from the University Aix Marseille.

Author Contributions

A.B. selected patients for septic shock diagnosis and verified the GWAs quality control, did almost all the computerization on the data base, participated in the data analysis and paper drafting. F.R. annotated and prioritized SNPs using bioinformatic tools, and performed experiments with cells, genome editing experiments, gene expression measurements, and luciferase assays; he participated in writing paper. C. D. carefully selected the adequate patients for septic shock, participated in GWAs statistical analysis, and in drafting content. S.B. participated in GWAs statistical analysis, and in drafting content. D.P. had decoded the transmitted database, put in an adequate format and participated in the bio-statistic strategy and paper writing; C.B. built all protein-protein model based on interaction with the significant SNPs and wrote this part in the manuscript. L.P. co-supervised functional studies, and participated in genome editing experiments, gene expression measurements, and luciferase assays, and in drafting content. P.R supervised all the GWAs analysis, co-supervised functional studies, fixed the strategy for SNPs analysis, control the coherence of the results and deeply participated in the paper writing. D.P. decided the research topic, negotiated the data base transmission from Eli Lilly Comp, fixed the clinical strategy for GWAs performance, participated in the genetic strategy and presentation, and deeply worked on the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests. DP was member of the scientific committee of the PROWESS project. He signed a formal free of charge contract between Eli Lilly and Co. (Eli Lilly and Co.; Indianapolis USA) the owner of the PROWESS database to use the GWAs data. All the presented results were obtained independently from Eli

Lilly Company that did no interfere with data analysis and writing process. The other authors report no potential conflict of interest.

Figure legends

Figure 1: Schematic outline of patient and SNP selection. After quality control of the SNP data, 896,358 SNPs and 832 patients having a septic shock were selected for genome-wide association analysis.

Figure 2: Genome-wide association results for early and late mortality. Manhattan plots show the $-\log_{10}$ (P value) for the association of SNPs with early (A) and late (C) mortality according to their position on the genome. The horizontal red line and the purple line correspond to a Bonferroni threshold and an FDR of 5%, respectively. ROC curves plotting sensitivity against 1-specificity are shown for the prediction of early (B) and late (C) mortality based on the effect of covariates/confounding factors (red), SNPs (green), and both (blue).

Figure 3: Subnetwork of the 27 connected protein encoded by genes associated with sepsis and their direct interactors. Orange proteins are those encoded by genes associated with early mortality. Green proteins are those encoded by genes associated with late mortality. Pink proteins are direct interactors of proteins encoded by associated genes. Figure A is the global network. Figure B zooms on proteins of interest.

Figure 4: Sepsis-associated SNPs in typical enhancers and super-enhancers. Radar plots show the density of noncoding SNPs within super-enhancers (A) and typical enhancers (B) in 12 tissue and cell types. The SNP density (SNP / 10 MB sequence) was calculated by first counting the number of SNPs within super-enhancers and typical enhancers, which was further divided by the numbers of base pairs of the super-enhancer or typical enhancer region in the same tissue or cell type, and then multiplied by 10 millions. The center of the plot is 0, the SNP density (SNP / 10 MB sequence) is shown on the respective axis for each tissue or cell type.

Figure 5: Schematic outline of noncoding SNP annotation and selection. SNiPA was used for looking for eQTL, whereas RSAT and ReMap were used for identifying transcription factors binding sequences containing the SNPs. Enhancer and super-enhancer annotation was based on a catalog. IW-scoring and TAGOOS methods were applied to rank the SNPs.

Figure 6: Prioritization of noncoding SNPs on the basis of IW-scoring method.

Figure 7: SNPs associated with mortality due to sepsis overlap enhancers in K562 cells and monocytes in the *CISH-MAPKAPK3* gene locus. Peaks of H3K4me3,

H3K4me1, and H3K27ac histone marks, and DNAse I hypersensitivity sites in K562 cells, peaks of ChIP-seq for transcription factors, and location of enhancer predicted by GeneHancer and super-enhancer in CD14+ monocytes are shown, whereas the genomic position of the SNPs associated with mortality due to sepsis and that of SNPs in linkage disequilibrium with them is stated (A). rs143356980, its flanking sequence, and the corresponding motifs of transcription factors are specified (B), whereas the deleted region in K562 cells (B) and the controls performed in 1B1, 5c, and 1B2 clones (C) are shown.

Figure 8: Enhancer effect of the genomic region containing rs143356980 on *CISH* expression. (A) *CISH* expression measurements in K562 cells and $K562^{-/-}$ cells either unstimulated or stimulated with IFN. (B) *CISH* expression measures in K562 cells and $K562^{-/-}$ cells either unstimulated or stimulated with LPS. Three experiments with triplicates were performed, leading to 9 measurements for each condition. The box plot of the mean of triplicates is shown for the three experiments. Mixed models that took into account the clustering of triplicates into the experiments were used to compare K562 cells to each $K562^{-/-}$ clone. P values are shown for the comparison of the unstimulated $K562^{-/-}$ clones with unstimulated K562 cells and for the comparison of the stimulated $K562^{-/-}$ clones with stimulated K562 cells: *** for $P<0.001$; ** for $P<0.01$; * for $P<0.05$.

Figure 9: Effect of rs143356980 on the enhancer activity. DNA sequences containing either rs143356980-C allele or rs143356980-T allele were cloned into a luciferase reporter that contained no promoter, a minimal promoter or *CISH* promoter. Three experiments with triplicates were performed, leading to 9 measurements for each condition. The box plot of the mean of triplicates is shown for the three experiments. Mixed models that took into account the clustering of triplicates into the experiments were used to compare the luciferase activity of the constructs, with a special emphasis of the comparison of constructs containing rs143356980-C allele with those containing rs143356980-T allele. P values are shown for unstimulated cells and stimulated cells.

Table 1. Characteristics of patients.

		Initial cohort (N = 832)		Survivors after 7 days (N = 698)	
	All cohort	Dead before day 7	Alive at day 7	Dead before day 28	Alive at day 28
	N = 832	N = 134	N = 698	N = 111	N = 587
Age (year)	67.3 ± 22.7[a]	70.8 ± 13.1	65.8 ± 24.0	71.4 ± 14.8	63.4 ± 24.5
Male sex (%)	467 (56.1)	78 (58.2)	389 (55.7)	66 (59.5)	323 (55)
Dotrecogin alpha (%)	407 (48.9)	59 (44)	348 (49.9)	44 (39.6)	304 (51.8)
Prior and preexisting conditions (%)					
Hypertension	297 (35.7)	53 (39.6)	244 (35.0)	43 (38.7)	201 (34.2)
Myocardial infarction	129 (15.5)	30 (22.4)	99 (14.2)	28 (25.2)	71 (12.1)
Congestive cardiomyopathy	67 (8.1)	7 (5.2)	60 (8.6)	20 (18)	40 (6.8)
Diabetes	169 (20.3)	30 (22.4)	139 (19.9)	27 (24.3)	112 (19.1)
Pancreatitis	30 (3.6)	5 (3.7)	25 (3.6)	4 (3.6)	21 (3.6)
Liver disease	14 (1.7)	3 (2.2)	11 (1.6)	4 (3.6)	7 (1.2)
COPD[b]	226 (27.2)	39 (29.1)	187 (26.8)	36 (32.4)	151 (25.7)
Cancer	169 (20.3)	33 (24.6)	136 (19.5)	29 (26.1)	107 (18.2)
Apache II score	25 ± 10	28 ± 11.8	25 ± 10	28 ± 9	24 ± 10
SOFA score[c]	8 ± 3	9.5 ± 3	8 ± 3	8 ± 3	8 ± 3
log(IL-6)[d]	6.4 ± 3.1	7.4 ± 4.0	6.1 ± 2.9	6.3 ± 2.6	6.1 ± 2.9

[a]Values are median ± inter-quartile interval.

[b]COPD denotes chronic obstructive pulmonary disease, and APACHE II Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II.

[c]The organ components of the Simplified Organ Failure Assessment (SOFA) scores were provided by the PROWESS dataset. We calculated the sum of the organ component SOFA scores except for the neuronal ones (not included in the data base).

[d]IL-6 plasma levels measured at day 1 were expressed in logarithm base 10 due to scattered values.

Due to rounding, not all percentages gave a total of 100.

Table 2. Significant covariates for GWAS

	Survival at day 7		Survival between d
	P-value	OR [CI][a]	P-value
Age (years)	4.98e-4	1.03 [1.01 ; 1.05]	1.62e-3
Gender (M/F)	NS	NS	NS
Hypertension	NS	NS	NS
Myocardial infarct	NS	NS	NS
Cardiomyopathy	NS	NS	1.53e-3
Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)	NS	NS	NS
Diabetes	NS	NS	NS
Liver disease	NS	NS	NS
Malignancy	NS	NS	NS
Pre-infusion APACHE score	NS	NS	NS
Log of baseline IL-6 concentration	2.64e-6	1.29 [1.16 ; 1.44]	NS
Treatment by Activated Prot C or not	NS	NS	2.22e-2
baseline SOFA score (without neuro component)	4.77e-2	1.10 [1.00 ; 1.22]	1.74e-2

[a]Confidence Interval

Table 3. Loci associated with the mortality due to sepsis at day 7 or at day 28

SNP	CHR : Position	Alleles (MAF)	Risk allele	P value (q value)	Unadjusted OR (adjusted OR)	LD region r2>0.8	Gen cont SNP
rs16857698	3 : 145685067	A > G (0.014)	G	1.75E-09 (7.53E-04)	3.52 (4.51)	3:145665563-145685067	
rs5029231	3 : 145701146	C > T (0.019)	T	1.37E-08 (1.73E-03)	3.54 (3.99)	3:145686379-145759412	
rs6763296	3 : 145709314	T > C (0.018)	C	2.55E-09 (7.53E-04)	3.93 (4.67)	3:145686379-145759412	
rs16857836	3 : 145752473	G > T (0.014)	T	5.51E-10 (4.89E-04)	3.79 (5.20)	3:145686379-145759412	
rs4544	8 : 143994806	T > C (0.010)	C	8.86E-09 (1.31E-03)	3.24 (6.87)	8:143983592-144018027	CYP1
rs11991278	8 : 144001245	C > T (0.010)	T	8.48E-09 (1.31E-03)	3.23 (6.87)	8:143983592-144018027	CYP1
rs6981918	8 : 144007939	C > A (0.010)	A	8.74E-09 (1.31E-03)	3.22 (6.85)	8:143983592-144018027	CYP1
rs956727	9 : 86846933	A > G (0.009)	G	3.22E-08 (2.60E-03)	4.85 (17.43)	9:86814655-86862104	SLC2
rs7974468	12 : 112927208	G > A (0.013)	A	1.60E-08 (1.78E-03)	3.10 (3.34)	12:112819245-112985734	PTPI
rs10849640	12 : 119712137	G > A (0.116)	A	3.22E-08 (2.60E-03)	1.65 (2.25)	12:119712137-119725314	
rs10849641	12 : 119721354	C > T (0.115)	T	2.65E-08 (2.60E-03)	1.67 (2.27)	12:119712137-119725314	
rs10849642	12 : 119725314	C > T (0.117)	T	4.04E-08 (2.99E-03)	1.62 (2.25)	12:119712137-119725314	
rs12491812	3 : 50556581	C > T (0.011)	T	4.18E-11 (1.25E-05)	5.62 (7.32)	3:50534635-50645413	CAC
rs2239753	3 : 50645158	T > C (0.011)	C	2.80E-11 (1.25E-05)	4.97 (7.02)	3:50555933-50645413	CISH
rs2239752	3 : 50645413	C > T (0.011)	T	5.43E-10 (4.86E-05)	4.32 (5.62)	3:50555933-50645413	CISH

rs2239751	3 : 50647888	A > C (0.011)	C	5.21E-10 (4.86E-05)	4.32 (5.62)	3:50531386-50875635	CISH
rs743753	3 : 50651395	C > T (0.011)	T	5.21E-10 (4.86E-05)	4.32 (5.62)	3:50531386-50875635	MAP
rs616689	3 : 50668532	G > A (0.014)	A	1.87E-10 (3.35E-05)	5.09 (5.79)	3:50647343-50751643	MAP
rs9879397	3 : 50685642	G > A (0.012)	A	8.79E-09 (6.57E-04)	4.00 (4.86)	3:50647343-50751643	MAP
rs2170840	3 : 50686517	A > C (0.014)	C	1.87E-10 (3.35E-05)	5.09 (5.78)	3:50647343-50751643	MAP
rs12492982	3 : 50698155	C > T (0.011)	T	4.18E-11 (1.25E-05)	4.85 (7.32)	3:50531386-50875635	MAP
rs2035484	3 : 50721892	A > G (0.011)	G	5.21E-10 (4.86E-05)	4.32 (5.62)	NA	DOC
rs17051403	3 : 50751643	C > A (0.011)	A	5.21E-10 (4.86E-05)	4.32 (5.62)	3:50531386-50875635	DOC
rs17072628	3 : 65229760	G > A (0.012)	A	8.25E-09 (6.57E-04)	3.88 (4.96)	3:65214495-65241577	
rs7840669	8 : 89929277	A > G (0.015)	G	2.38E-08 (1.53E-03)	4.23 (3.77)	8:89901960-90133835	
rs7953683	12 : 79993704	C > T (0.024)	T	3.07E-08 (1.72E-03)	2.06 (2.07)	12:79919466-80080618	PAW
rs1502522	17 : 51544776	A > G (0.029)	G	2.57E-08 (1.53E-03)	3.24 (2.64)	17:51519876-51590268	
rs1393467	17 : 51560869	T > C (0.029)	C	2.57E-08 (1.53E-03)	3.24 (2.64)	17:51519876-51590268	

Table 4. Adjusted and unadjusted OR for cumulative effect of allele risk at leader SNPs

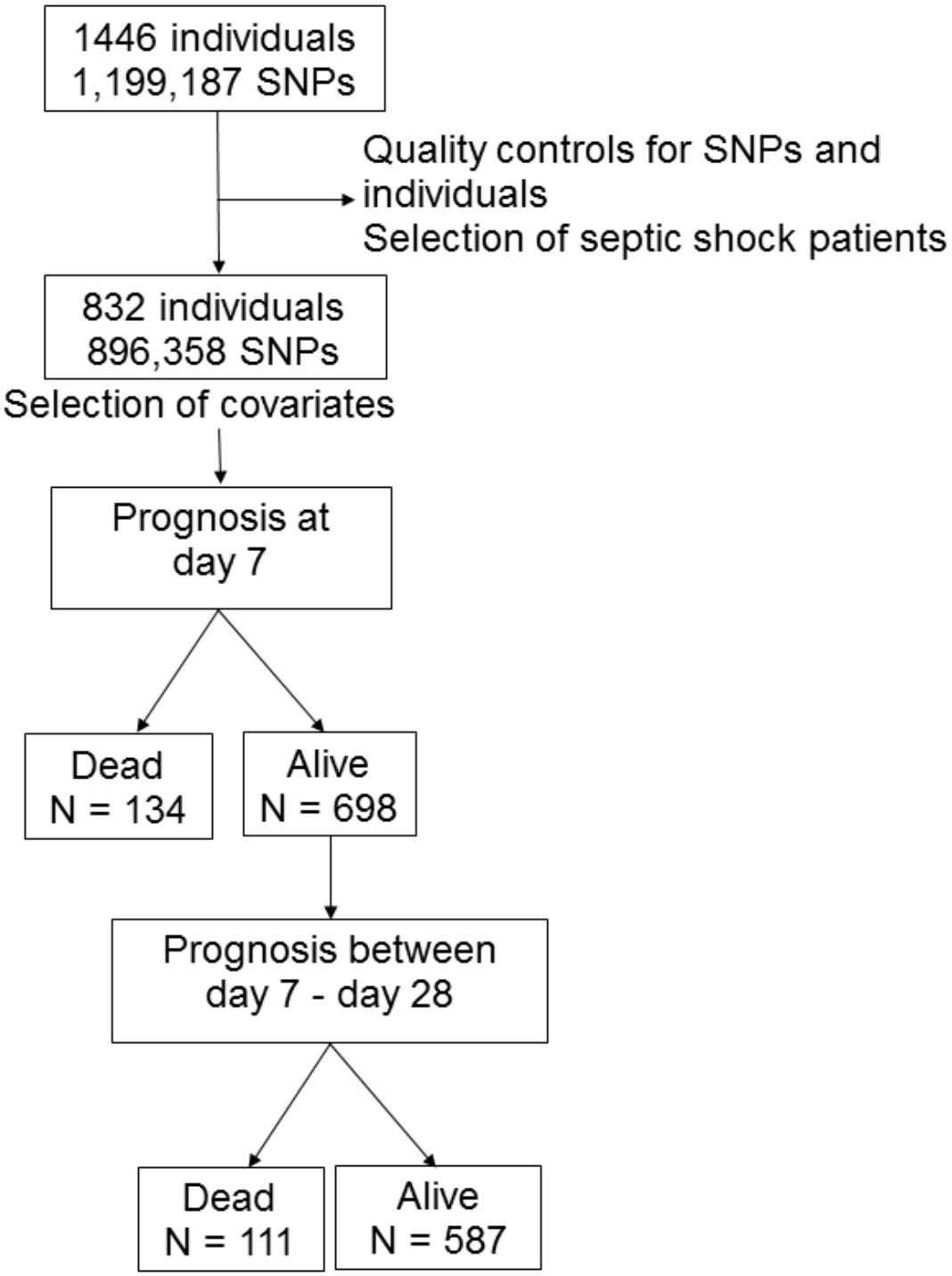
	Early death		Late death	
Nb of risk alleles	Non adjusted OR	Adjusted OR	Non adjusted OR	Adjusted OR
0	1	1	1	1
1	1.56	1.44	4.75	3.53
2	1.71	1.58	7.95	7.82
3	3.38	3.48	17.96	17.86
>=4	9.40	12.33	70.75	123.35

Table 5. List of the proteins associated with mortality

HGNC Symbol	Uniprot Symbol	Presence in the interactome	Presence in the sub-network
ADAP2	ADAP2_HUMAN	yes	yes
ANKFN1	ANKF1_HUMAN	no	no
ANKH	ANKH_HUMAN	yes	yes
ARIH1	ARI1_HUMAN	yes	yes
ASIC2	ASIC2_HUMAN	yes	yes
ATAD5	ATAD5_HUMAN	yes	yes
C3orf18	CC018_HUMAN	no	no
C6orf170	BROMI_HUMAN	no	no
CACNA2D2	CA2D2_HUMAN	no	no
CISH	CISH_HUMAN	yes	yes
CRLF3	CRLF3_HUMAN	yes	yes
CYP11B2	C11B2_HUMAN	no	no
DOCK3	DOCK3_HUMAN	yes	yes
DPYD	DPYD_HUMAN	yes	yes
EHMT1	EHMT1_HUMAN	yes	yes
FER	FER_HUMAN	yes	yes
GML	GML_HUMAN	no	no
GPR158	GP158_HUMAN	yes	yes
GREM2	GREM2_HUMAN	yes	no
HECTD4	HECD4_HUMAN	no	no
HEMK1	HEMK1_HUMAN	yes	yes
IFIT1B	IFT1B_HUMAN	no	no
KPTN	KPTN_HUMAN	yes	yes

LBP	LBP_HUMAN	yes	yes
LIPA	LICH_HUMAN	no	no
MAPKAPK3	MAPK3_HUMAN	yes	yes
NAPA	SNAA_HUMAN	yes	yes
NCKAP5	NCKP5_HUMAN	yes	yes
NLN	NEUL_HUMAN	no	no
OSCP1	OSCP1_HUMAN	no	no
PAWR	PAWR_HUMAN	yes	yes
PPFIA2	LIPA2_HUMAN	yes	yes
PTPN11	PTN11_HUMAN	yes	yes
RBFOX1	RFOX1_HUMAN	yes	yes
RPL6	RL6_HUMAN	yes	yes
RNF135	RN135_HUMAN	yes	yes
SLC15A1	S15A1_HUMAN	yes	no
SLC28A3	S28A3_HUMAN	no	no
SLFN13	SLN13_HUMAN	no	no
SLFN12L	SN12L_HUMAN	no	no
SYNC	SYNCI_HUMAN	yes	yes
SYT1	SYT1_HUMAN	yes	yes
TRAFD1	TRAD1_HUMAN	yes	no
U6	SNR27_HUMAN	yes	yes
WDR85	DPH7_HUMAN	no	no

Figure 1. Schematic outline of patient and SNP selection



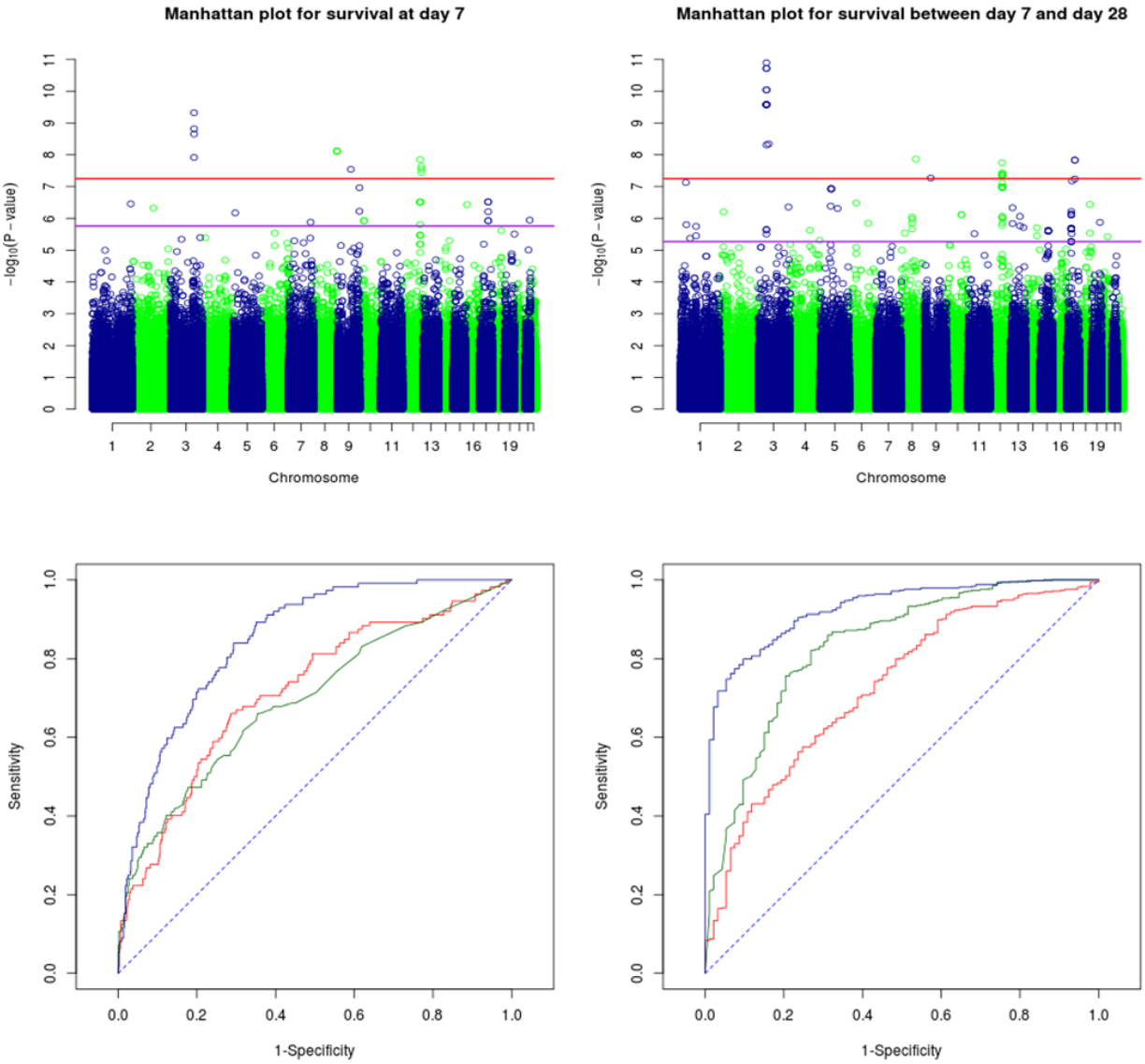


Figure 2: Genome-wide association results for early on the left and late mortality on the right

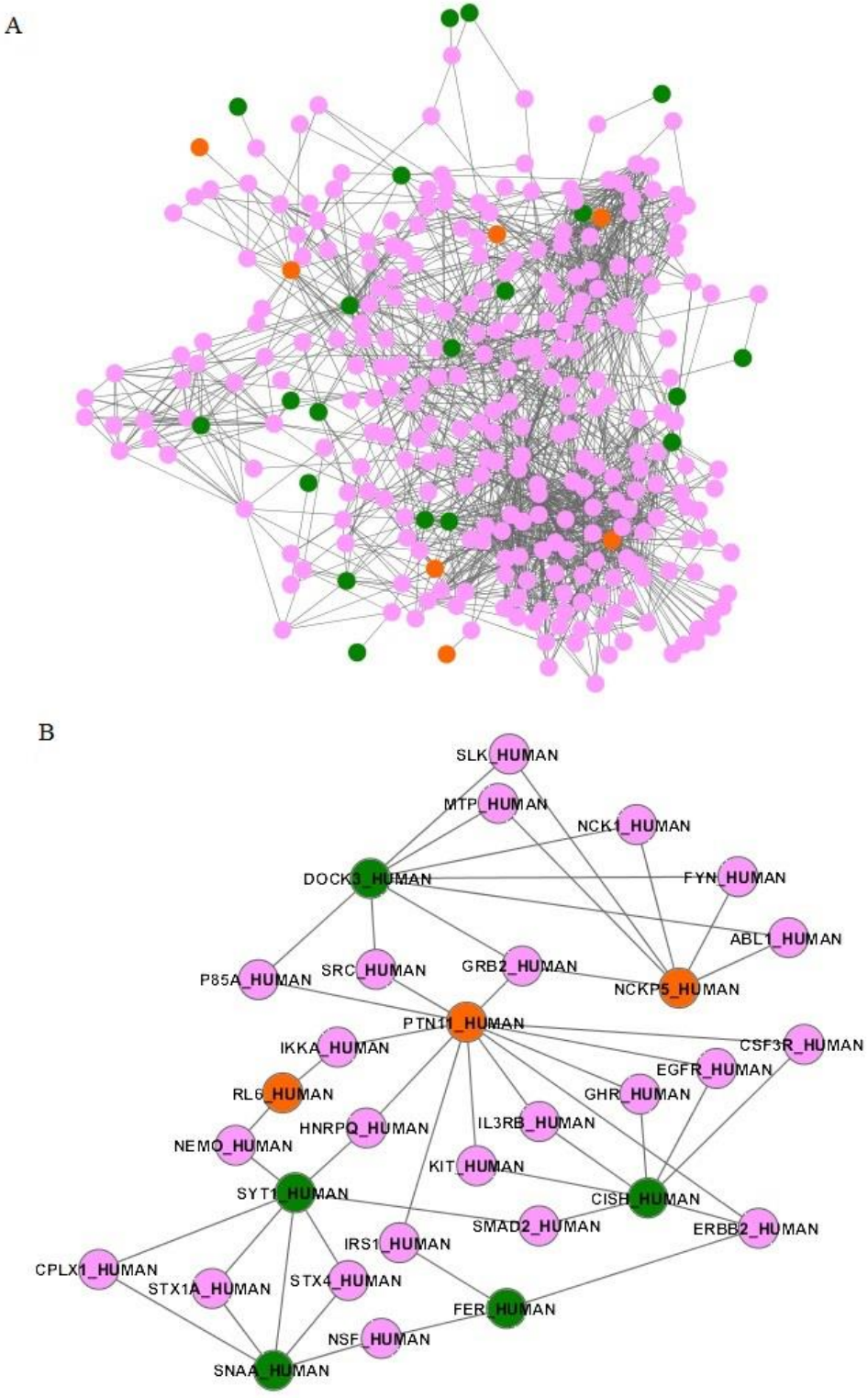
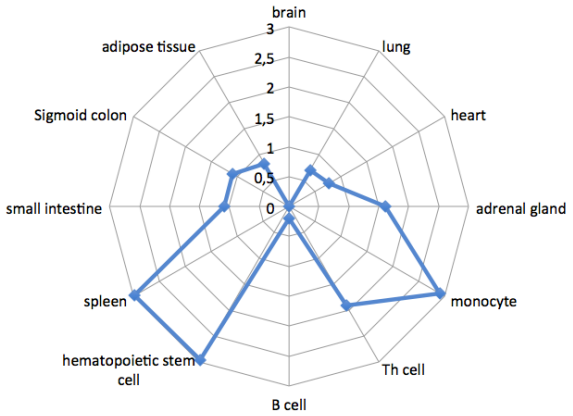


Figure 3. Subnetwork of the 27 connected protein encoded by genes associated with sepsis and their direct interactors.

A



B

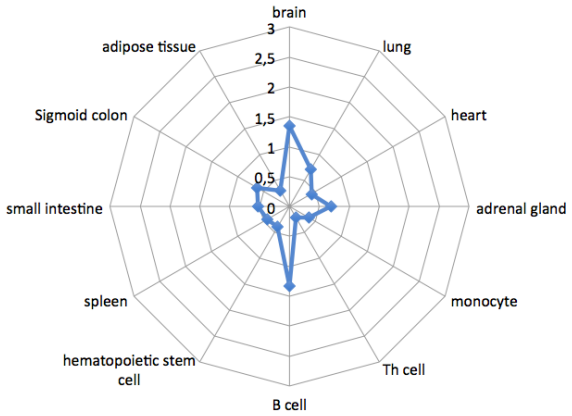


Figure 4: sepsis-associated SNPs in super-enhancers (A) and typical enhancers (B)

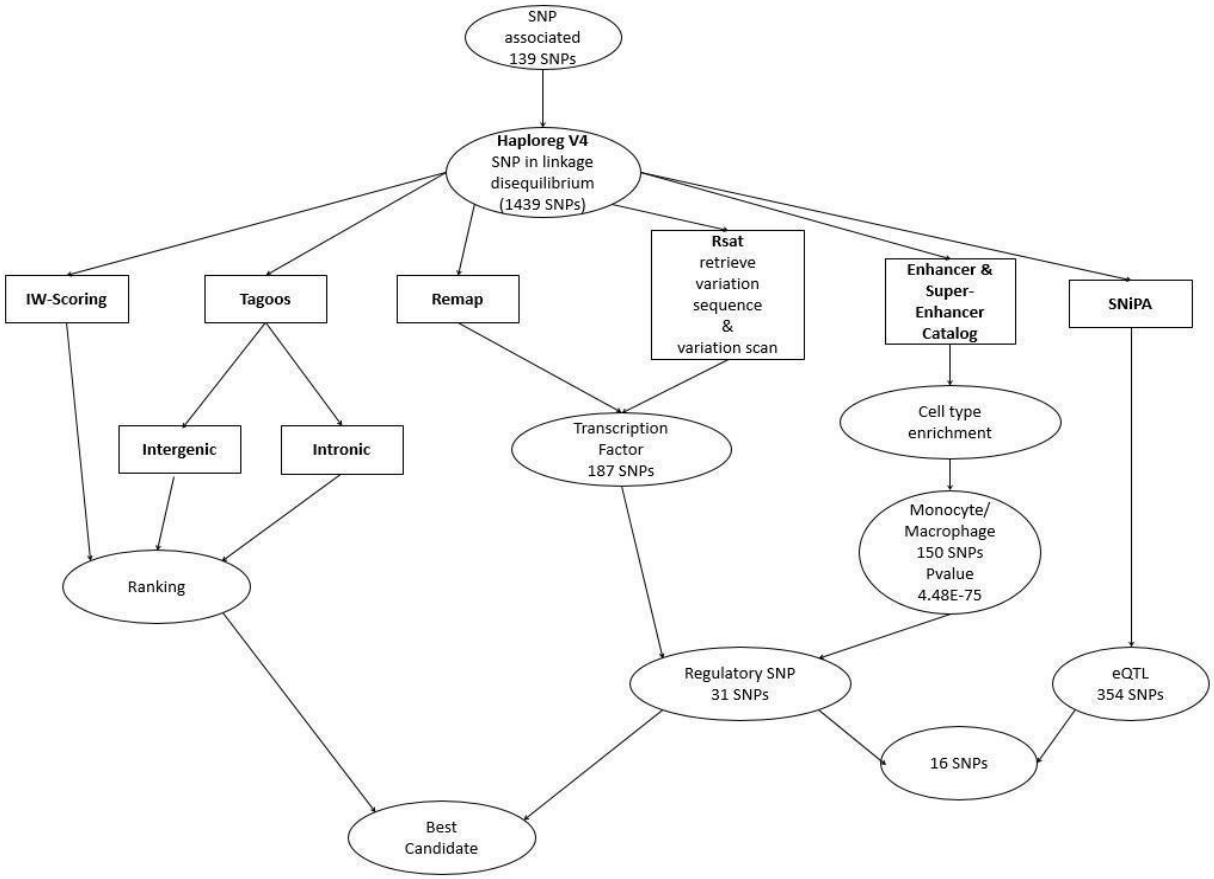


Figure 5: Schematic outline of noncoding SNP annotation and selection

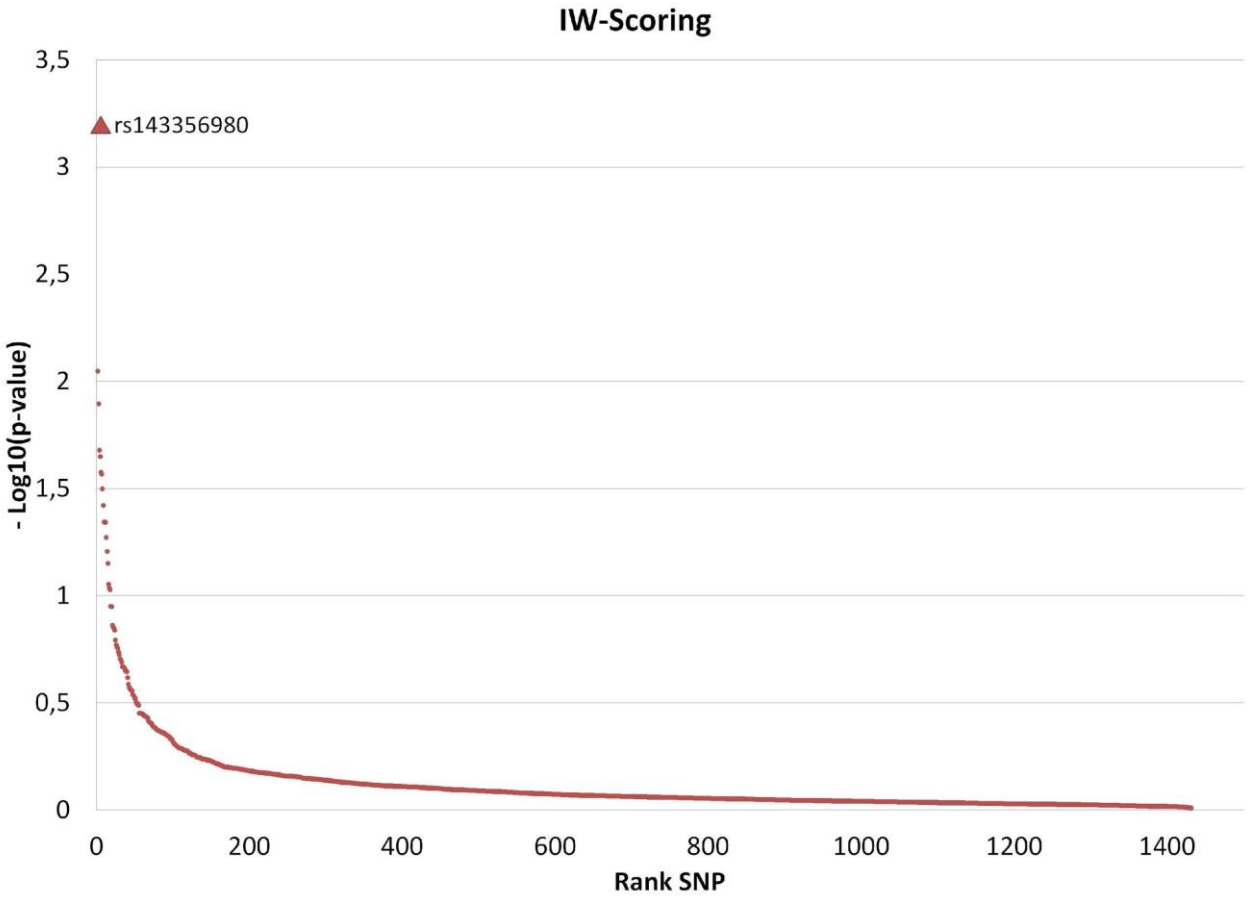


Figure 6: Prioritization of noncoding SNPs on the basis of IW-scoring method.

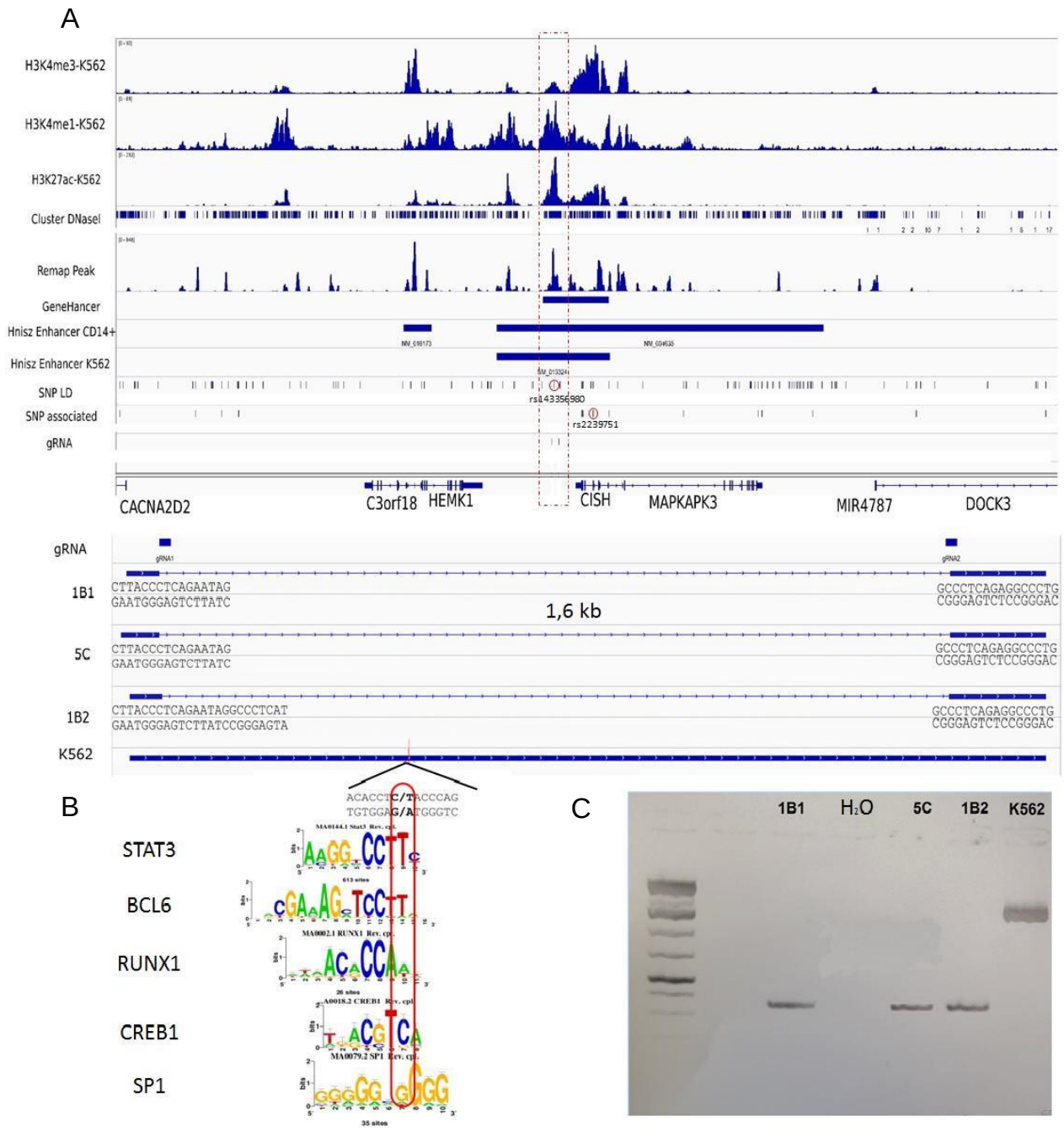


Figure 7: SNPs associated with mortality due to sepsis overlap enhancers in K562 cells and monocytes in the *CISH-MAPKAPK3* gene locus.

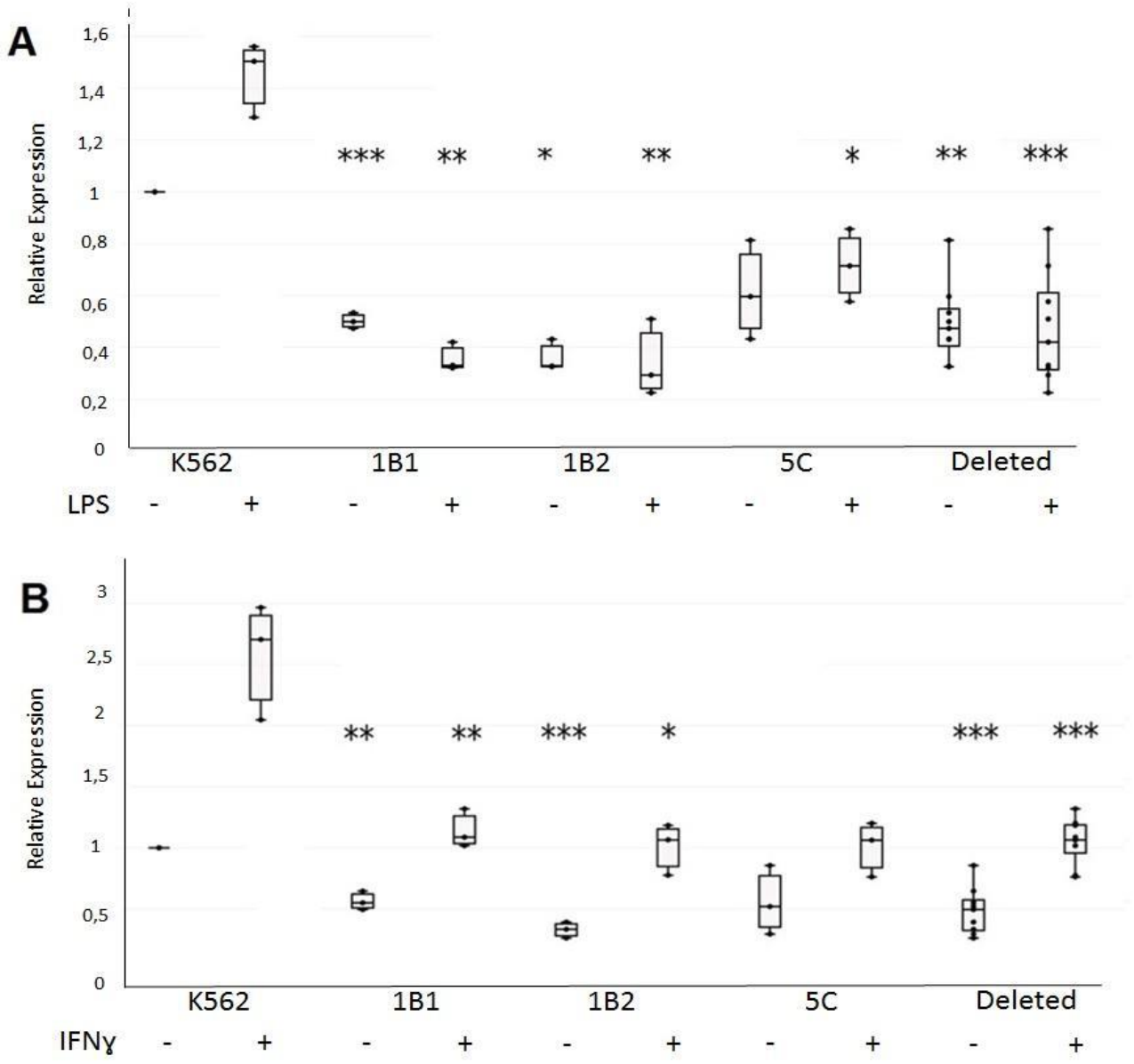


Figure 8: Enhancer effect of the genomic region containing rs143356980 on *CISH* expression.

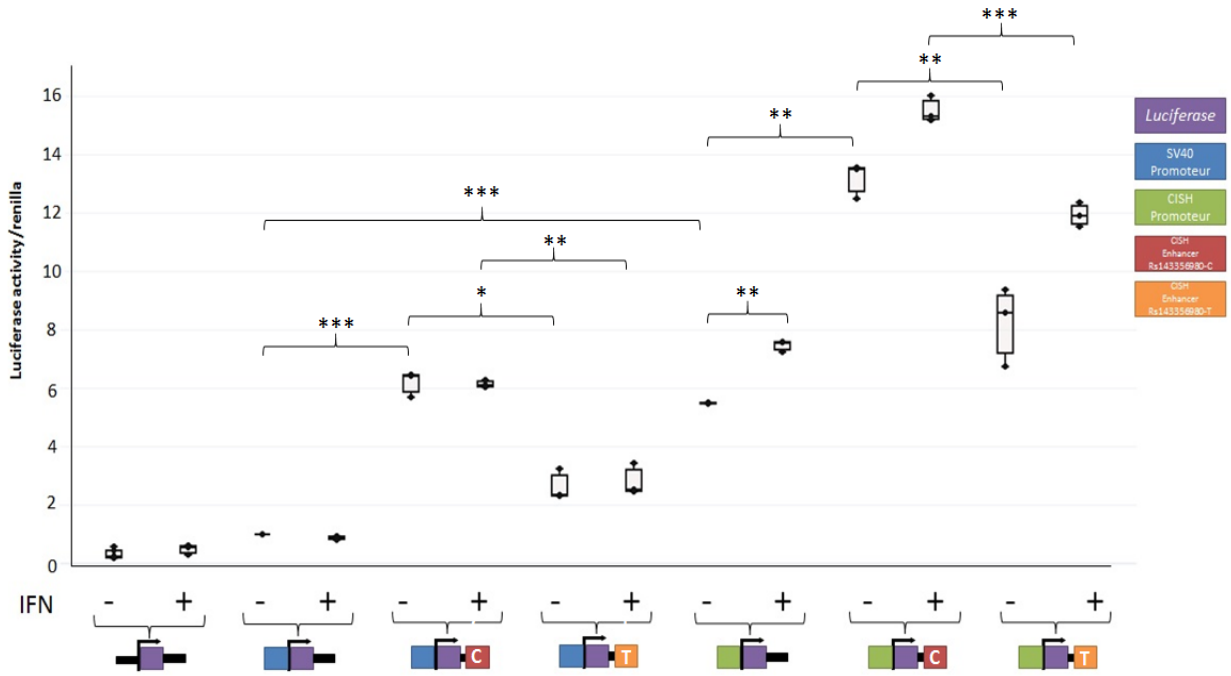


Figure 9: Effect of rs143356980 on the enhancer activity.

Discussion et perspective

Analyse transcriptomique de la réponse des cellules péritonéales de souris et comparaison avec la réponse septique humaine

Le modèle souris dans les pathologies humaines a toujours été l'objet d'un débat dans la communauté scientifique. En particulier, 2 études menées par des personnes différentes, sur le même jeu de données, ont conduit les auteurs à des conclusions opposées sur le modèle souris. Le premier publié par Junhee Seok (Seok et al., 2013) conclut que le modèle souris ne représente pas le sepsis humain tandis que celui de Takao K (Takao & Miyakawa, 2015) conclu totalement le contraire.

J'ai étudié la réponse transcriptomique au LPS des cellules péritonéales à 2 temps le premier après 1 heure et le second à 40 heures. J'ai pu identifier 2346 gènes différentiellement exprimés. On peut voir que certains clusters sont caractéristiques de phases importantes de la réponse immunitaire lors du sepsis. Par exemple le cluster 3 est caractéristique de la tempête cytokinique décrite dans le sepsis on y retrouve des gènes comme le TNF, l'IL6, l'IL1B, LTA, NOD2 ou encore le TLR2. Les enrichissements pour ce cluster comprennent "macrophage_peri_LPS_thio_1hrs", "TNF signaling pathway", "NF-kappa B signaling pathway" mais encore "response to lipopolysaccharide" (GO:0032496). On peut aussi voir dans ce cluster des gènes comme l'IL10 ou SOCS3 qui sont des régulateurs négatifs de la réponse immunitaire comme montré dans la Figure 10.

Un autre cluster intéressant est le cluster 6 qui contient des gènes augmentant au cours du temps avec des gènes de l'inflammation comme l'IFNγ mais aussi des gènes comme CISH, SOCS1 ou IL19 qui sont impliqués dans l'inhibition du système immunitaire. On peut observer des enrichissements pour des termes comme "response to interferon-gamma", "chemokine signaling pathway", ou "regulation of chemotaxis". Cela illustre probablement la phase d'inhibition de la réponse proinflammatoire, voire la phase d'immunosuppression qui se met en place.

J'ai comparé ces résultats avec des études chez l'homme. La première étude est celle de Godec (Godec et al., 2016) qui a cherché à évaluer si le modèle murin représente les phénomènes observés chez l'homme. On a pu observer un chevauchement significatif les gènes différentiellement exprimés dans notre modèle souris et les gènes identifiés dans l'étude de Godec et al. La seconde Fairfax (Fairfax et al., 2014) concernait la réponse des monocytes stimulés au LPS ou à l'IFNγ. J'ai observé un chevauchement entre la réponse transcriptionnelle des monocytes humains stimulés au LPS et celle des cellules péritonéales murines stimulés pendant 1h et pendant 40h au LPS également. Enfin, j'ai montré que notre étude a fourni des résultats similaires à ceux obtenus chez des patients atteints de sepsis. En effet, si on compare nos résultats avec l'étude de Davenport (Davenport

et al., 2016), j'ai identifié de nombreux gènes dérégulés en commun suggérant que notre modèle souris était un bon reflet de la réponse de patients qui meurent de sepsis.

Grâce à cette analyse, je propose que notre modèle murin de sepsis peut être utilisé pour démontrer des hypothèses de travail sur le sepsis chez l'homme. La figure 10 ci-dessous est adaptée d'une revue proposant une explication pour la mortalité précoce liée à une inflammation excessive et pour la mortalité tardive liée à une immunosuppression rendant les patients hautement sensibles aux infections. Ce graphique qui se base sur la théorie 1 montrée dans l'introduction (Figure 5) pourrait être aussi l'image des phases de la réponse transcriptionnelle dans notre modèle souris, avec un pic inflammatoire et la mise en place progressive de mécanismes anti-inflammatoires et d'immunosuppression.

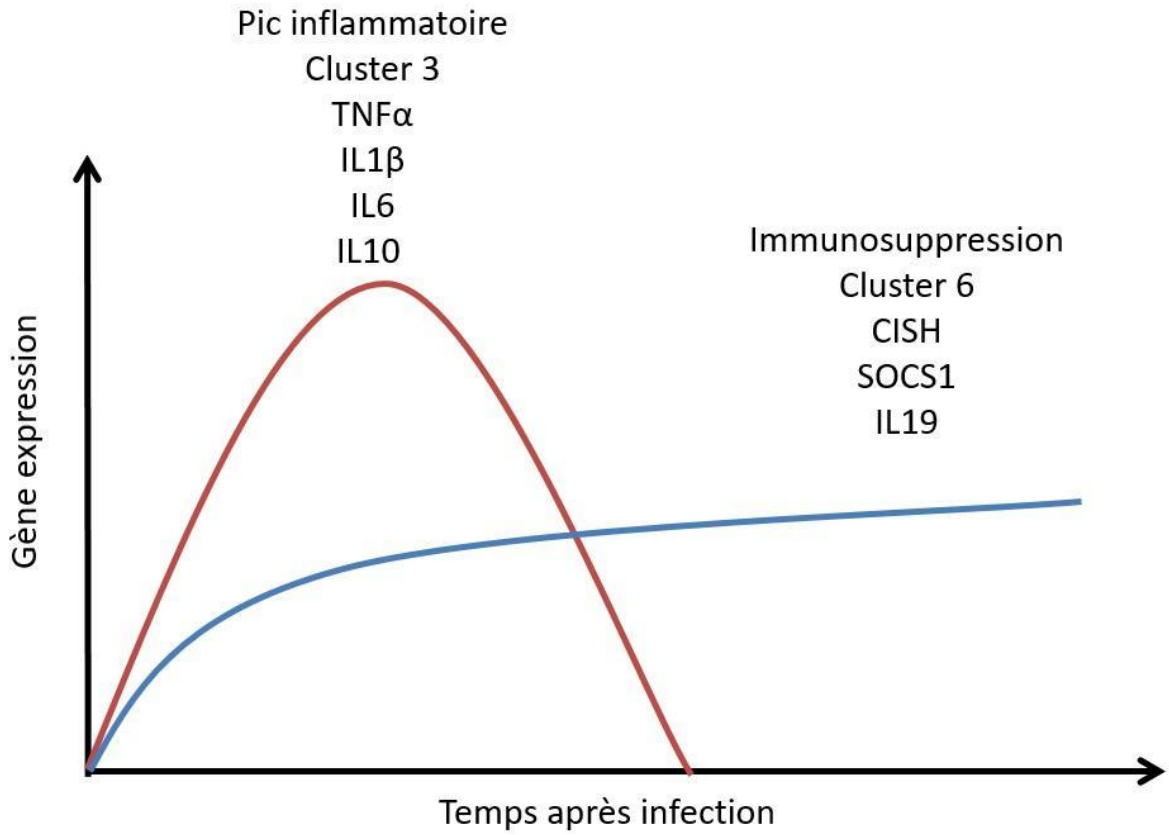


Figure 10 : Modèle de la réponse inflammatoire des cellules péritonéales chez les souris injectées avec du LPS d'après nos résultats
On peut observer que les gènes du cluster 3 représentent principalement des gènes dont l'expression augmente rapidement, lors du pic inflammatoire, avant de diminuer et que ceux du cluster 6 ont une expression qui augmente au cours du temps et sont impliqués dans l'immuno-tolérance

Analyse de SNPs régulateurs dans le non codant

Nous sommes partis d'une analyse GWAS effectuée dans une cohorte qui ciblait exclusivement des patients souffrant de choc septique dans une population européenne. Il existe des preuves de plus en plus nombreuses de l'existence de mécanismes potentiellement différents pour la mort précoce avant 7 jours par rapport à la mort tardive entre 7 et 28 jours ont ensuite été prises en compte pour tester les associations SNP. Avec un FDR de 5 %, 32 et 107 SNP ont été associés à une mortalité précoce et tardive, respectivement. Après avoir identifié les SNPs en DL situés dans les régions non codantes, nous avons effectué des analyses bioinformatiques des SNPs se focalisant sur i) la perturbation des sites de fixation de facteurs de transcription, ii) sur le contexte chromatinien au niveau des SNPs dépendant du type cellulaire, iii) sur l'analyse des effets eQTL des SNPs en DL avec les SNPs associés avec le décès précoce (avant 7 jours) ou tardif (entre 7 et 28 jours) au choc septique. Puis, nous avons décidé de tester le meilleur candidat par des approches expérimentales (délétion de la région par Crispr-Cas9 et luciférase assay).

Cela nous a permis de montrer l'effet du SNP rs143356980 dans les cellules K562. Les blastes K-562 sont des cellules hématopoïétiques malignes multipotentes qui se différencient spontanément en progéniteurs reconnaissables de la série érythrocytaire, granulocytaire et monocytaire.

Nous avons pu observer que la région contenant le SNP régule l'expression du gène *CISH* (Cytokine-inducible SH2-containing protein) également connue comme gène *SOCS* (Suppressor of cytokine signaling 1) ou *SSI* (Signal transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor). L'expression de ce gène peut être induite par IL-2, IL-3, GM-CSF, EPO ou IFNɣ dans les cellules hématopoïétiques. Ces gènes vont activer la voie JAK2-STAT5 induisant la phosphorylation de STAT5 et la formation d'un dimère qui va aller se fixer sur le promoteur de *CISH* pour en activer la transcription.

Les protéines de la famille SOCS font partie d'un système classique de rétroaction négative qui régule la transduction du signal des cytokines. La protéine CISH participe à la régulation négative des cytokines qui sont activées par la voie JAK2-STAT5. CISH inhibe la trans-activation de STAT5 en supprimant sa phosphorylation de tyrosine et peut être un composant de reconnaissance de substrat d'un complexe ubiquitine-ligase de la protéine E3 de type SCF (Elongin BC-CUL2/5-SOCS-box protein), le complexe ubiquitine-ligase de la protéine E3 qui intervient dans l'ubiquitination et la dégradation protéasomique.

Un modèle de régulation possible du gène *CISH* par le SNP rs143356980 (Figure 11) peut s'expliquer par le facteur de transcription Sp1 qui est connu pour interagir avec STAT5 (Martino, Holmes, Lord, Moon, & Nelson, 2001). En effet, Sp1 est un

facteur de transcription majeur qui intervient dans l'expression d'un grand nombre de gènes constitutifs dont les produits jouent un rôle central dans de nombreux processus physiologiques, dans la fonction de *housekeeping* et dans la réparation des organes et les réponses anti-inflammatoires (Ye, Liu, Gong, & Liu, 2015). Ces mécanismes, pour lesquels CISH est un acteur important, sont prédominants lors de la phase tardive du sepsis (entre 7 et 28 jours). De plus comme l'indique l'analyse bioinformatique Sp1 se fixe de manière préférentielle sur rs143356980-C pouvant activer plus fortement l'expression de CISH en comparaison à rs143356980-T.

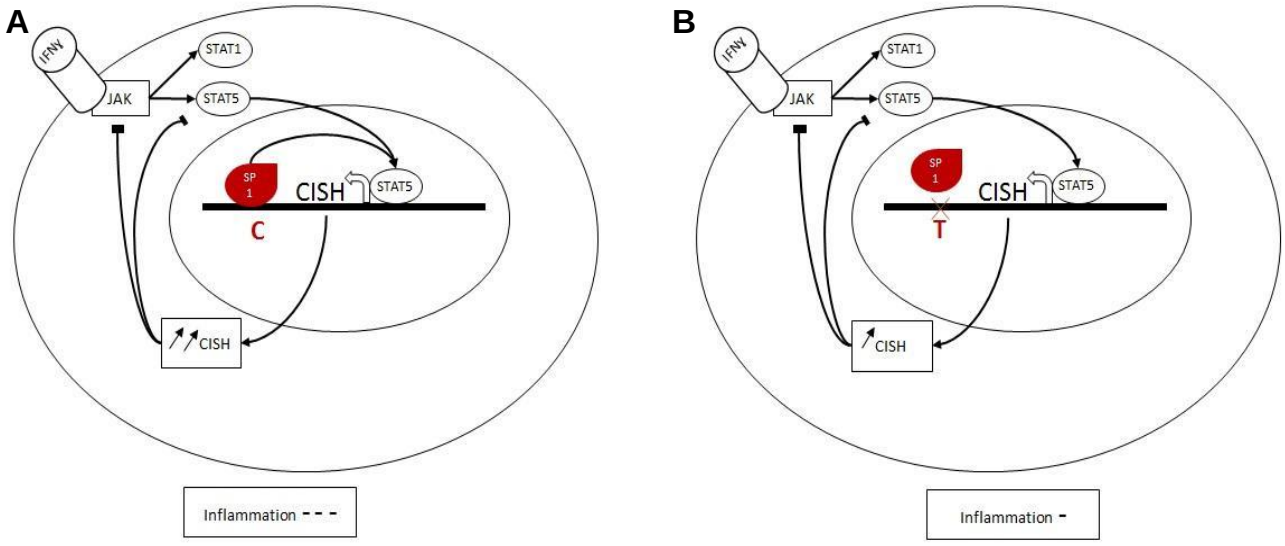


Figure 11 : Modèle de régulation du rs143356980 dans les monocytes/macrophages
A) rs14335690-C B) rs143356980-T
Dans le modèle avec rs143356980-C le facteur de transcription Sp1 se fixe sur l'enhancer ce qui va induire l'expression normale de CISH celui-ci va alors induire une inhibition de STAT5 et donc une forte inhibition de l'inflammation avec une diminution des Treg. Dans le second modèle avec rs143356980-T l'expression de CISH est diminuée ce qui va permettre de garder un certain niveau d'inflammation et une activation de ces cellules Treg.

Il a été montré qu'un autre SNP, le rs414171, situé dans le promoteur du *CISH,* altère l'expression de ce gène (Khor et al., 2010; L. Sun et al., 2014). En effet il a été montré dans ces articles que l'allèle de risque rs414171-T entraîne la diminution de l'expression du *CISH* car cette mutation perturbe le site de fixation notamment de STAT5 et entraîne une susceptibilité à la tuberculose via une diminution de l'expansion des cellules Treg. De plus il a été montré que CISH comme SOCS3 ont un rôle dans l'inhibition de la voie de l'IFNγ (Trengove & Ward, 2013). Cela corrspond à la théorie 2 de l'introduction où les patients meurent d'une défaillance d'organe induite par la réponse inflammatoire incontrolable.

Si on compare les 78 SNPs identifiés comme étant associés au sepsis de la Table 3 (Introduction page 82), on peut s'apercevoir que seul rs2239751 est commun avec

nos SNPs associés qui est en fort déséquilibre, dans la population CEU, avec rs143356980. Par contre, on peut aussi observer que 6 gènes sont communs (CD14, CISH, FER, LBP, NFKB1, TNFRSF1A) entre les gènes de notre réseau d'interaction protéine-protéine et les gènes associés. (Tableau 3)

Malgré ces résultats, il faut souligner que la composante génétique n'est que très partiellement expliquée par l'effet individuel des SNPS identifiés par les GWAS. Ainsi, les analyses GWAS ne prennent pas en compte certains types de variants génétiques comme les variants rares (Génin, 2019; Génin & Clerget-Darpoux, 2015), les mutations somatiques, les variations structurales ou encore les transposons (Chuong, Elde, & Feschotte, 2017; Wicker et al., 2007). Enfin, il est probable que les variants génétiques agissent conjointement sur les phénotypes.

Effet combinatoire de SNP dans le phénotype (épistasie)

Ainsi, nous aurions pu tester l'effet combinatoire de plusieurs SNPs en même temps. L'épistasie est due à des interactions, soit entre des polymorphismes (SNP), des gènes ou des loci de traits quantitatifs (QTL), qui entraînent des effets non linéaires qui contrôlent la variation des phénotypes. L'épistasie peut avoir une grande influence sur la variation phénotypique. La plupart des études se sont concentrées sur des tests génétiques additifs sur un seul locus (Lippert et al., 2013; Ma, Keinan, & Clark, 2014). Cependant, ce n'est pas le seul type d'association génétique. Une analyse de l'interaction SNP-SNP à l'échelle du génome devrait permettre de mieux comprendre l'architecture génétique qui sous-tend la variation des caractères complexes. Par conséquent, on accorde de plus en plus d'attention à l'épistasie, ce qui a donné lieu à de précieuses découvertes. Récemment, une analyse de l'interaction SNP-SNP à l'échelle du génome a été effectuée chez l'Homme (Hibar et al., 2015). Cependant, l'étude des interactions épistatiques prend énormément de puissance de calcul et de temps, en effet à partir de 10^6 SNPs on obtient plus de 5*10^11 combinaisons.

Un bon exemple d'effet épistatique intra-locus est la dérégulation d'un même motif de facteur de transcription où chaque SNP seul ne suffit à perturber le motif mais l'effet combinaison des 2 oui. Cet effet a été démontré au TAGC (Nguyen et al., 2017) pour le gène du TNF et les SNPs TNF-308, TNF-244 et TNF-238, de plus ils ont retrouvés co-localisés avec les sites de fixation d'une quinzaine de facteurs de transcription (pour les variants TNF-244 et TNF-238), dont la plupart sont identiques, suggérant un effet conjoint des 2 SNPs.

De plus, on sait que les *enhancers* et promoteurs interagissent sur de grande distance cela peut expliquer pourquoi 2 SNPs peuvent avoir un effet épistatique. Comme moyen de documenter ces interactions sont les études de Hi-C où l'on pourrait tester si l'interaction d'un *enhancer,* contenant un SNP avec un allèle

particulier, avec un promoteur contenant un autre SNP, avec toujours un allèle particulier, est toujours présente si on mute un des 2 SNPs voir les 2.

Classement des SNPs non codants à l'aide d'outil utilisant le *machine learning*

Les algorithmes de *machine learning* sont récemment devenus populaires pour l'annotation SNP en raison de leurs multiples facettes pour la prédiction basée sur des méthodes statistiques robustes. Ces puissants outils sont capables de construire des modèles prédictifs complexes de la fonction SNP. Toutes ces méthodes intègrent des données fonctionnelles et la plupart intègrent des données de conservation pour former leurs modèles de prévision, chacun utilisant différents modèles et approches. Bien que puissants, les méthodes de *machine learning* sont sensibles aux biais que l'on trouve dans les ensembles d'apprentissage et les annotations, comme l'enrichissement des variants près des gènes, les lacunes dans les annotations fonctionnelles ou la sur-adaptation due à un paramétrage sous-optimal ou à l'insuffisance des données de formation. Il faut prendre beaucoup de précautions pour limiter l'effet de ces biais sur la prédiction des tendances. De plus, le fondement de la catégorisation fonctionnelle peut ne pas être intuitif, car les raisons de l'annotation peuvent ne pas être directement indiquées dans les résultats. Comme chaque outil utilise des données différentes ainsi que des méthodes de calcul différentes, on peut s'attendre à des biais dans les résultats d'analyse des SNPs. La différence des résultats entre les différents programmes de classement d'impact des SNPs non codants peut être expliquée en prenant comme information les résultats utilisés dans chaque outil. En effet, chaque outil utilisant des informations différentes, les résultats ne peuvent être que différents.

Dans ma thèse et pour l'article *Genome-wide association studies and integrative analyses identify a genetic variant modulating CISH expression and altering the risk of death in septic shock patients from Genome-wide association studies to a functional risk genetic variant for death in septic shock patient,* j'ai utilisé 2 outils de classement IW-scoring (Wang, Dayem Ullah, & Chelala, 2018) ainsi que TAGOOS (TAG SNP bOOsting) (González, Artufel, & Rihet, 2019). Si on compare, pour les 1439 SNPs, les résultats des 2 outils on peut voir que les résultats des 2 outils ne sont pas corrélés (Figure 12). TAGOOS utilise plusieurs jeux de données : le premier **Expressed enhancers** qui est une base de données décrivant les régions *enhancer* définies par CAGE dans le projet FANTOM5 ; **ENCODE** une liste complète des éléments fonctionnels du génome humain, y compris les éléments qui agissent au niveau des protéines et de l'ARN, et les éléments régulateurs qui contrôlent les cellules et les circonstances dans lesquelles un gène est actif ; **ReMap** (Chèneby, Gheorghe, Artufel, Mathelier, & Ballester, 2018) un catalogue des résultats de ChIP-seq à partir d'ensembles de données publics et d'ensembles de données Encode ; **Roadmap** qui a pour but de cartographier la méthylation de l'ADN, les modifications

des histones, l'accessibilité à la chromatine et les petits transcrits d'ARN dans les cellules souches et les tissus primaires ex vivo sélectionnés pour représenter les homologues normaux des tissus et des systèmes organiques fréquemment impliqués dans les maladies humaines ; **Young H3K27ac** un catalogue d'*enhancer* et de *super-enhancer* dans différents types cellulaires, et enfin **GTEx** (Genotype-Tissue Expression) une ressource publique complète pour étudier l'expression et la régulation des gènes spécifiques aux tissus. Le portail GTEx offre un accès ouvert aux données, y compris l'expression génétique, les QTL et les images histologiques. Dans le cas d'IW-scoring, l'outil utilise 2 étapes différentes la première est l'annotation de l'effet du SNP en utilisant ENCODE, Epigenome et FANTOM5 puis la seconde étape est le scoring des SNPs en utilisant 11 outils de prédiction comprenant CADD v1.3, DeepSEA, Eigen (Eigen and Eigen-PC), fitCons, FunSeq2, FATHMM-MKL, GWAVA (region, TSS and unmatched scores) et ReMM.

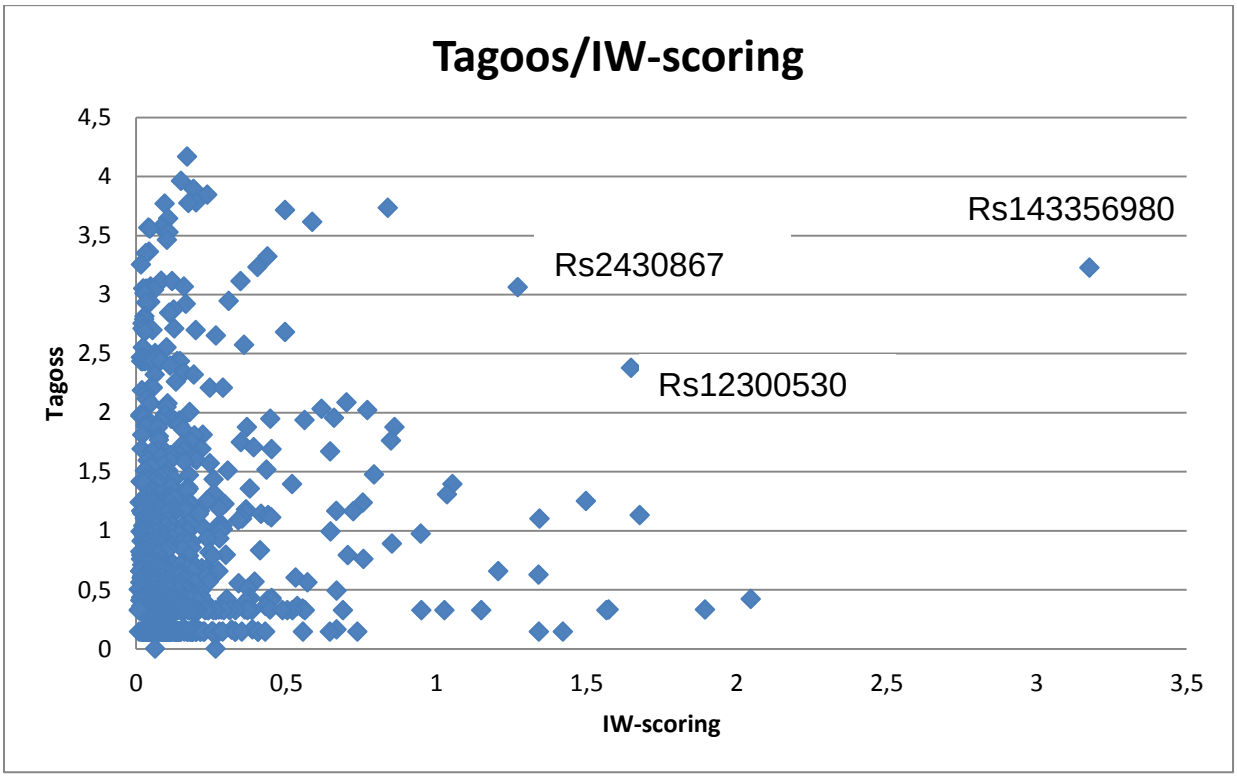


Figure 12 : Plot des –Log10(p-valeur) des outils Tagoos et IW-scoring
On peut voir que l'on n'observe pas de corrélation dans le classement des SNPs selon les 2 outils. Par contre seul rs143356980 a un très bon score avec ces outils

Du fait de ces différences il est difficile de choisir des SNPs à prioriser. Il est raisonnable de ne garder que les SNPs ayant les meilleurs scores dans les 2 outils ce qui limite les résultats. L'autre solution est de continuer de faire manuellement ce genre d'analyse et de conforter ses résultats avec des analyses bioinformatiques complémentaires. Enfin, une dernière possibilité est de développer et appliquer des

méthodes d'analyses expérimentales à haut débit pour évaluer l'impact régulateur réel des SNPs non codants.

Etude de l'effet expérimental des SNPs régulateurs à haut débit

La dissection expérimentale des régions *enhancer* et de promoteurs est coûteuse, laborieuse, à faible débit et à faible résolution, n'ayant pas la résolution nécessaire pour localiser les nucléotides régulateurs individuels sans recourir à une mutagenèse. Plusieurs études récentes de gènes rapporteurs à haut débit pour la fonction d'*enhancer* permettent de tester simultanément des milliers voir de millions de séquences d'ADN distinctes, en clonant des fragments d'ADN variables dans des constructions de rapporteurs, et en utilisant le séquençage à haut débit pour quantifier l'activité régulatrice des fragments. Les approches fondées sur la synthèse (p. ex. MPRA) (Tewhey, Kotliar, Park, 2016; Ulirsch, Nandakumar, Wang, . 2016) utilisent la technologie de synthèse des oligonucléotides pour générer des éléments et des codes à barres couplés (Figure 13). Les approches de fragmentation du génome (p. ex., STARR-seq, Cap-STARR-seq (Vanille, Griffon, Maqbool, Zacarias-Cabeza, Dao, Fernandez, Ballester, Andrau, Spicuglia. 2015), ChIP-STARR) utilisent des fragments d'ADN recueillis ou capturés à partir d'ADN génomique. Pour les approches basées sur la synthèse, les limitations techniques de la technologie de synthèse des oligonucléotides limitent la longueur des fragments d'ADN testés à 130-230 nucléotides et le nombre de constructions testées. La technique appelée Massively Parallel Reporter Assays (MPRAs) se base sur le même principe que les techniques de luciferase assay mais au lieu de tester les SNPs un par un on peut en tester des milliers/millions à la fois. Le but est de créer une banque d'oligonucléotides contenant les variants de chaque SNPs. Cette banque peut être clonée dans un plasmide pSTARR-seq_human utilisé pour générer la banque de plasmides (plasmide Addgene #71509) après un promoteur. Puis, on transfecte cette banque de plasmides dans des cellules d'intérêts. Ces cellules vont produire des ARNm à partir du plasmide qui vont être les séquences des oligonucléotides insérées. Ainsi, la quantité de reads de l'élément régulateur est directement proportionnelle à son activité enhancer sur le promoteur. Après alignement, on peut voir quel SNP a des effets régulateurs, et on peut ranger les SNPs du plus actif au moins actif, comparer les allèles les uns par rapport aux autres, dans des cellules stimulées ou pas.

Cette technique peut être utilisée pour compléter les analyses de classements de SNPs utilisant des algorithmes de *machine learning* et supprimer les techniques de luciférase assay puisqu'il permet de tester l'impact régulateur de tous les variants en une seule fois. Par contre cette technique ne permet que de comparer l'effet des variants sur l'activité *enhancer* mais ne permet pas de connaître les mécanismes moléculaires dérégulés par ces SNPs. Cela nécessite toujours des analyses

bioinformatiques et des validations expérimentales de type Crispr-Cas9 et qPCR qui permettent de disséquer plus précisément les processus de régulation des SNPs et d'identifier leurs gènes cibles. Une continuité à notre analyse pourrait être de tester tous les SNPs en déséquilibre de liaison dans notre étude en utilisant la technique de MPRA (Figure 13).

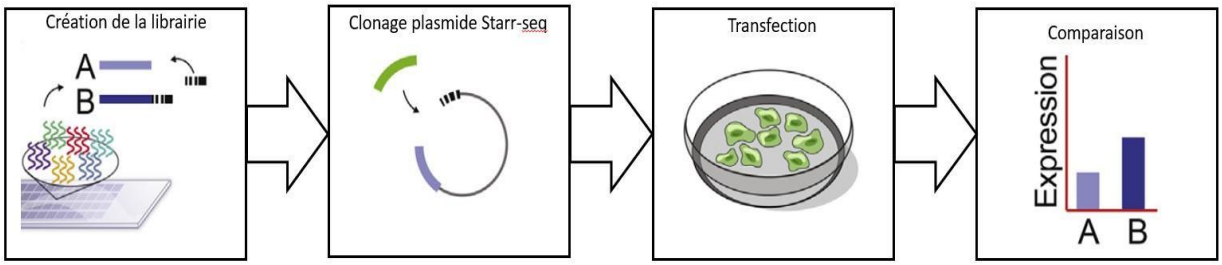


Figure 13 : Protocole résumé pour les expériences de MPRA

Des variants génétiques régulateurs, des gènes différentiellement exprimés, et des modèles biologiques du sepsis

La comparaison de la liste des 45 gènes proches des SNPs associés au sepsis (notre GWAS) ou en déséquilibre de liaison avec les gènes différentiellement exprimés dans notre étude transcriptomique souris (2361 gènes) a permis d'identifier cinq gènes communs: Adap2 appartient au Cluster4 et est impliqué dans l'augmentation de la stabilité des microtubules, Atad5 au Cluster5 qui est impliqué dans l'équilibre entre la survie cellulaire et l'apoptose, Cish au Cluster6, Lipa au Cluster6 qui catalyse l'hydrolyse des esters cholestéryliques et des triglycérides et Trafd1 au Cluster5 un autre régulateur négatif de la réponse immunitaire.

Une étude complémentaire serait de tester l'effet du SNP rs143356980 dans un modèle de souris. Si on compare la région que nous avons délété par Crispr-cas9 et qui contient ce SNP dans le génome humain avec le génome de souris, on peut voir que la région est plutôt conservée comme le montre la figure 14 ci-dessous (81% d'identité sur 319bp).

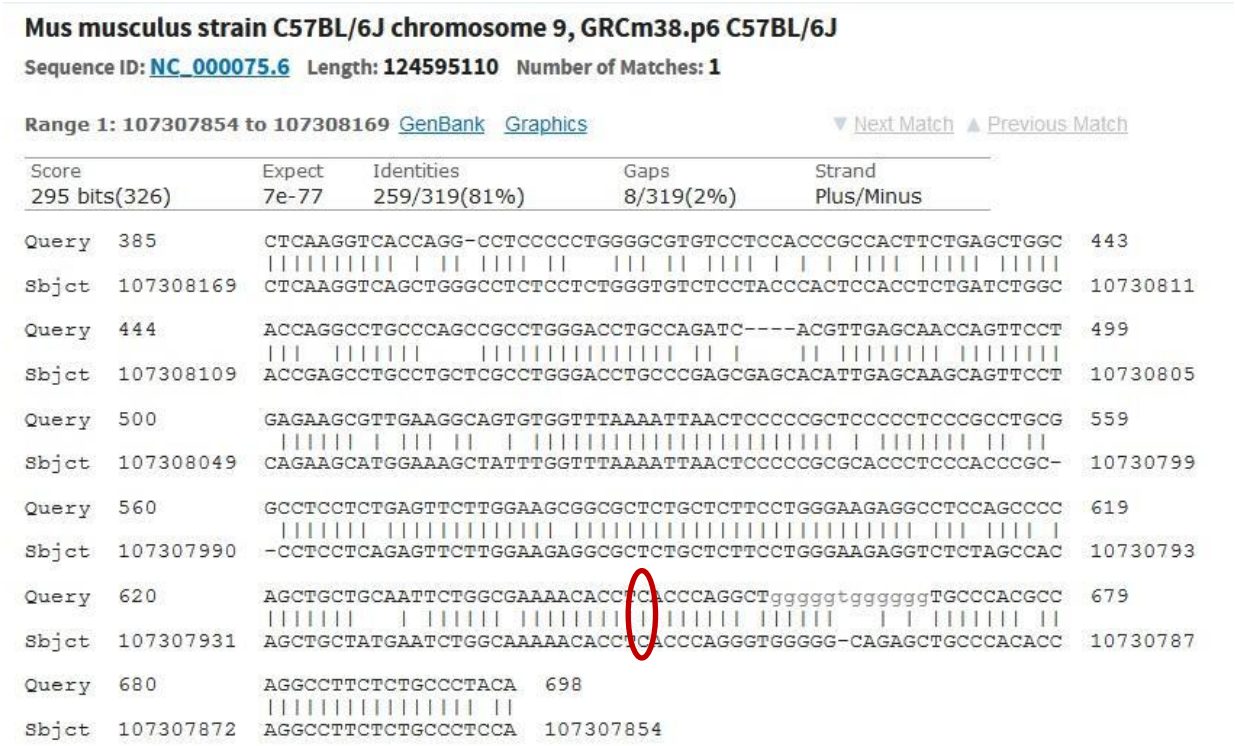


Figure 14 : Comparaison entre la séquence délétée par crispr-cas9 dans notre étude et le génome de mus musculus. Position de rs143356980.

Comme nous avons testé l'impact in vitro de ce SNP une possibilité serait de créer une mutation C-> T dans des macrophages de souris et de regarder l'impact de

cette mutation sur la réponse de ces macrophages dans un modèle in vivo de souris injectées au LPS, et sur la survie des souris comme montré dans la Figure 15.

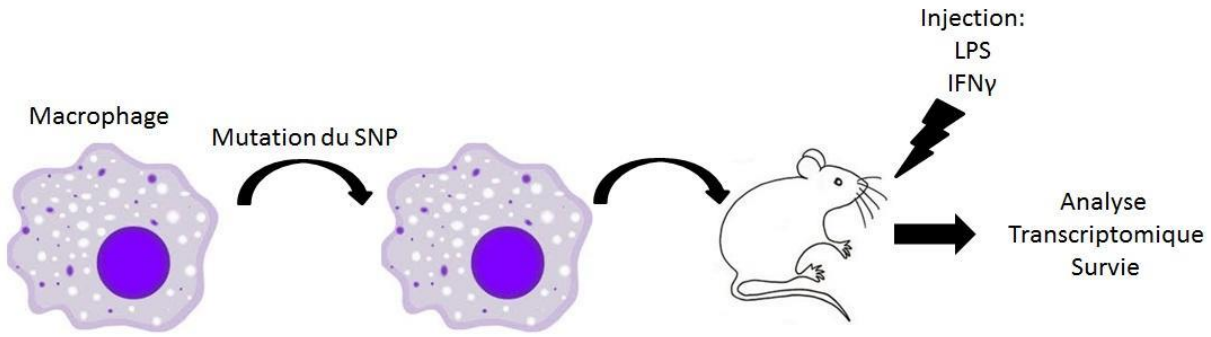


Figure 15 : Stratégie pour tester l'effet du rs143356980 dans in modèle in vivo

L'intégration des données de GWAS ainsi que les données de transcriptomique chez la souris permet de suggérer un modèle théorique qui est un mélange des 2 théories citées dans l'introduction. En effet, des chercheurs (Richard S. Hotchkiss et al., 2013) ont suggéré que la réponse immunitaire s'oriente vers un modèle d'immuno-tolérance. Cependant, nous et d'autres équipes (Khor et al., 2010; L. Sun et al., 2014) avons montré que des variations génétiques présentes chez l'homme peuvent moduler de l'expression d'une protéine. Le CISH, en inhibant plus ou moins l'inflammation pourrait faire basculer les phénomènes d'immuno-tolérance vers un modèle d'activation continu de celui-ci. Ceci aurait pour conséquence une défaillance d'organes. Ce dernier modèle a été suggéré par Delano (Delano & Ward, 2016a).

La modification de la réponse immunitaire d'une théorie vers une autre peut être aussi liée aux phénomènes de reprogrammation des monocytes et des macrophages dans les modèles de doubles hits montrés par Saeed et al. (Saeed et al., 2014). Dans cette étude, il a été montré que selon le type d'activation antérieure des macrophages (par du LPS ou du β-Glucan), ceux-ci auront un mode de réponse différent. Les macrophages stimulés auparavant par du LPS deviennent immuno-tolérants et ne peuvent plus répondre suite à une seconde stimulation (théorie 1), alors que si ceux-ci sont auparavant stimulés par du β-Glucan, ils répondront mieux lors du second hit ce qui suggère une éducation des macrophages.

Conclusion

Le sepsis est une pathologie qui touche environ 30 millions de personnes dans le monde et en tue approximativement 6 millions par an. Cette pathologie a changé 3 fois de définition et est aujourd'hui définie par une infection qu'elle soit parasitaire, fongique ou bactérienne combinée avec un score SOFA supérieur ou égale à 2. De plus, il existe une forme grave de la pathologie appelé choc septique.

La réponse des différents types cellulaires impliqués dans l'immunité chez les patients a longtemps fait débat. Il a été montré qu'il existe 2 périodes de décès importantes, la première correspond au décès avant 7 jours et est très probablement due à une trop forte activation de la réponse inflammatoire, la deuxième correspond au décès entre 7 et 28 jours, la cause de ces décès suscitant de long débats dans la communauté scientifique. Deux théories se sont souvent affrontées. La première explique que les patients meurent de l'infection car une phase d'immuno-tolérance chez les patients survient chez les patients tandis que la seconde soutient que les patients meurent d'une défaillance organique causée par la réponse inflammatoire forte et trop longue.

Ainsi au cours de ma thèse, j'ai pu démontrer que ces 2 phénomènes (rattaché aux théories 1 et 2) étaient interconnectés. On a pu montrer que la réponse dans le modèle murin de sepsis peut être utilisé pour tester des hypothèses de travail sur le sepsis chez l'homme ; cette réponse ressemble à celle décrite dans la première théorie où on observe une première phase de réponse inflammatoire très forte appelée tempête cytokinique suivie d'une diminution de la réponse inflammatoire qui est dûe à la réponse anti-inflammatoire entraînant une immuno-paralysie. Enfin, nous avons effectué une analyse GWAS sur une cohorte de patient atteint de choc septique. On a identifié l'impact régulateur du rs143356980 C->T qui a pour effet de diminuer l'expression du *CISH* chez les patients qui meurent pendant la phase tardive.

Pour conclure, le sepsis induit une multitude de défauts de l'immunité qui provoquent une inflammation prolongée, une suppression immunitaire, une susceptibilité aux infections et la mort. L'issue de la survie des patients est dépendante d'un équilibre entre la réponse inflammatoire et la réponse anti-inflammatoire. Si cette dernière est trop importante, elle entraine une paralysie de la réponse immunitaire. Dans ce cas, l'infection peut se développer. Alors que si cette réponse anti-inflammatoire n'est pas assez forte, celle-ci ne permet pas une réparation des organes endommagés par la réponse inflammatoire.

Bien que de nouvelles méthodologies basées sur les cellules, de type cellule unique, soient disponibles pour identifier les patients présentant une dysrégulation immunitaire durant le sepsis, on ne sait toujours pas quelles interventions ciblant les déficits spécifiques aux cellules seront les plus bénéfiques. Les interventions thérapeutiques qui ont été tentées jusqu'à aujourd'hui ne fonctionnent pas. Ce n'est pas étonnant compte tenu de la complexité des réponses immunitaires qui sont

reliées, peuvent agir dans des sens opposés et de durées excessives. Le patient nécessite probablement une thérapie individualisée impliquant une surveillance fréquente de la fonction immunitaire. Une thérapie immunomodulatrice dirigée vers plusieurs cibles pourrait éventuellement être envisagée.

Bibliographie

Al Olama, A. A., Dadaev, T., Hazelett, D. J., Li, Q., Leongamornlert, D., Saunders, E. J., … Kote-Jarai, Z. (2015). Multiple novel prostate cancer susceptibility signals identified by fine-mapping of known risk loci among Europeans. *Human Molecular Genetics*. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv203

Albert, F. W., & Kruglyak, L. (2015). The role of regulatory variation in complex traits and disease. *Nature Reviews Genetics*. https://doi.org/10.1038/nrg3891

Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Abecasis, G. R., Bentley, D. R., Chakravarti, A., Clark, A. G., … Lacroute, P. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature11632

Alves-Filho, J. C., Freitas, A., Souto, F. O., Spiller, F., Paula-Neto, H., Silva, J. S., … Cunha, F. Q. (2009). Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. https://doi.org/10.1073/pnas.0900196106

Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., … Sandelin, A. (2014). An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature12787

Andersson, R., Sandelin, A., & Danko, C. G. (2015). A unified architecture of transcriptional regulatory elements. *Trends in Genetics*. https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.05.007

Andrades, M. T., Morina, A., Spasić, S., & Spasojević, I. (2011). Bench-to-bedside review: Sepsis - from the redox point of view. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/cc10334

Andreu-Ballester, J. C., Tormo-Calandín, C., Garcia-Ballesteros, C., Pérez-Griera, J., Amigó, V., Almela-Quilis, A., … Ballester, F. (2013). Association of γδ T cells with disease severity and mortality in septic patients. *Clinical and Vaccine Immunology*. https://doi.org/10.1128/CVI.00752-12

Ardawi, M. S. M., & Newsholme, E. A. (1982). Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. *Biochemical Journal*. https://doi.org/10.1042/bj2080743

Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Bentley, D. R., Chakravarti, A., … Schloss, J. A. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature15393

Ba, X., & Garg, N. J. (2011). Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases. *American Journal of Pathology*. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.004

Barrangou, R. (2014). Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1252964

Battle, A., Khan, Z., Wang, S. H., Mitrano, A., Ford, M. J., Pritchard, J. K., & Gilad, Y. (2015). Impact of regulatory variation from RNA to protein. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1260793

Benjamim, C. F., Lundy, S. K., Lukacs, N. W., Hogaboam, C. M., & Kunkel, S. L. (2005). Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood*. https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3251

Bernstein, B. E., Stamatoyannopoulos, J. A., Costello, J. F., Ren, B., Milosavljevic, A., Meissner, A., … Thomson, J. A. (2010). The NIH roadmap epigenomics mapping consortium. *Nature Biotechnology*. https://doi.org/10.1038/nbt1010-1045

Blattler, A., & Farnham, P. J. (2013). Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.R113.512517

Blattler, A., Yao, L., Witt, H., Guo, Y., Nicolet, C. M., Berman, B. P., & Farnham, P. J. (2014). Global loss of DNA methylation uncovers intronic enhancers in genes showing expression changes. *Genome Biology*. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0469-0

Bo, L., Wang, F., Zhu, J., Li, J., & Deng, X. (2011). Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and

granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: A meta-analysis. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/cc10031

Bone, R. C., Grodzin, C. J., & Balk, R. A. (1997). Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. https://doi.org/10.1378/chest.112.1.235

Boomer, J. S., To, K., Chang, K. C., Takasu, O., Osborne, D. F., Walton, A. H., … Hotchkiss, R. S. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. https://doi.org/10.1001/jama.2011.1829

Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., … Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. https://doi.org/10.1038/35013070

Bosmann, M., & Ward, P. A. (2013). The inflammatory response in sepsis. *Trends in Immunology*, *34*(3), 129–136. https://doi.org/10.1016/j.it.2012.09.004

Boyle, A. P., Hong, E. L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M. A., Kasowski, M., … Snyder, M. (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*. https://doi.org/10.1101/gr.137323.112

Boyle, A. P., Song, L., Lee, B. K., London, D., Keefe, D., Birney, E., … Furey, T. S. (2011). High-resolution genome-wide in vivo footprinting of diverse transcription factors in human cells. *Genome Research*. https://doi.org/10.1101/gr.112656.110

Brahmamdam, P., Inoue, S., Unsinger, J., Chang, K. C., McDunn, J. E., & Hotchkiss, R. S. (2010). Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*. https://doi.org/10.1189/jlb.0110037

Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., … Singer, M. (2002). Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09459-X

Brealey, D., Karyampudi, S., Jacques, T. S., Novelli, M., Stidwill, R., Taylor, V., … Singer, M. (2004). Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., … Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1092385

Broquet, A., Roquilly, A., Jacqueline, C., Potel, G., Caillon, J., & Asehnoune, K. (2014). Depletion of natural killer cells increases mice susceptibility in a pseudomonas aeruginosa pneumonia model. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000311

Browning, S. R., & Browning, B. L. (2007). Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. *American Journal of Human Genetics*. https://doi.org/10.1086/521987

Brudecki, L., Ferguson, D. A., McCall, C. E., & Gazzar, M. El. (2012). Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infection and Immunity*. https://doi.org/10.1128/IAI.00239-12

Buckley, C. D., Gilroy, D. W., & Serhan, C. N. (2014). Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.009

Buniello, A., Macarthur, J. A. L., Cerezo, M., Harris, L. W., Hayhurst, J., Malangone, C., … Parkinson, H. (2019). The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D1005–D1012. https://doi.org/10.1093/nar/gky1120

Canver, M. C., Bauer, D. E., Dass, A., Yien, Y. Y., Chung, J., Masuda, T., … Orkin, S. H. (2014). Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced

palindromic repeats (CRISPR)/cas9 nuclease system in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.564625

Carson IV, W. F., Cavassani, K. A., Dou, Y., & Kunkel, S. L. (2011). Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*. https://doi.org/10.4161/epi.6.3.14017

CARTWRIGHT, G. E., ATHENS, J. W., & WINTROBE, M. M. (1964). THE KINETICS OF GRANULOPOIESIS IN NORMAL MAN. *Blood*.

Cavaillon, J. M., & Adib-Conquy, M. (2005). Monocytes/macrophages and sepsis. *Critical Care Medicine*, *33*(12 SUPPL.), 10–13. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000185502.21012.37

Cazalis, M. A., Friggeri, A., Cavé, L., Demaret, J., Barbalat, V., Cerrato, E., … Venet, F. (2013). Decreased HLA-DR antigen-associated invariant chain (CD74) mRNA expression predicts mortality after septic shock. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/cc13150

Chang, D. W., Tseng, C. H., & Shapiro, M. F. (2015). Rehospitalizations following sepsis: Common and costly. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001159

Chang, K. C., Burnham, C. A., Compton, S. M., Rasche, D. P., Mazuski, R. J., SMcDonough, J., … Hotchkiss, R. S. (2013). Blockade ofthe negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/cc12711

Cheadle, W. G., Wilson, M., Hershman, M. J., Bergamini, D., Richardson, J. D., & Polk, H. C. (1989). Comparison of trauma assessment scores and their use in prediction of infection and death. *Annals of Surgery*. https://doi.org/10.1097/00000658-198905000-00005

Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/nri3405

Cheng, S. C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shepardson, K. M., Saeed, S., Kumar, V., … Netea, M. G. (2014). MTOR- and HIF-1α-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1250684

Cheng, S. C., Scicluna, B. P., Arts, R. J. W., Gresnigt, M. S., Lachmandas, E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., … Netea, M. G. (2016). Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nature Immunology*. https://doi.org/10.1038/ni.3398

Cheron, A., Floccard, B., Allaouchiche, B., Guignant, C., Poitevin, F., Malcus, C., … Monneret, G. (2010). Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/cc9331

Chiche, L., Forel, J. M., Thomas, G., Farnarier, C., Cognet, C., Guervilly, C., … Papazian, L. (2012). Interferon-γ production by natural killer cells and cytomegalovirus in critically ill patients. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318260c90e

Claussnitzer, M., Dankel, S. N., Kim, K. H., Quon, G., Meuleman, W., Haugen, C., … Kellis, M. (2015). FTO obesity variant circuitry and adipocyte browning in humans. *New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502214

Coetzee, S. G., Coetzee, G. A., & Hazelett, D. J. (2015). MotifbreakR: An R/Bioconductor package for predicting variant effects at transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv470

Coetzee, S. G., Rhie, S. K., Berman, B. P., Coetzee, G. A., & Noushmehr, H. (2012). FunciSNP: An R/bioconductor tool integrating functional non-coding data sets with genetic association studies to identify candidate regulatory SNPs. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gks542

Colbert, J. F., & Schmidt, E. P. (2016). Endothelial and Microcirculatory Function and Dysfunction in Sepsis. *Clinics in Chest Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.01.009

Collage, R. D., Howell, G. M., Zhang, X., Stripay, J. L., Lee, J. S., Angus, D. C., & Rosengart, M. R.

(2013). Calcium supplementation during sepsis exacerbates organ failure and mortality via calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase signaling. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31828cf436

Cowley, H. C., Bacon, P. J., Goode, H. F., Webster, N. R., Jones, J. G., & Menon, D. K. (1996). Plasma antioxidant potential in severe sepsis: A comparison of survivors and nonsurvivors. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/00003246-199607000-00019

Cuenca, A. G., Delano, M. J., Kelly-Scumpia, K. M., Moreno, C., Scumpia, P. O., LaFace, D. M., … Moldawer, L. L. (2011). A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Molecular Medicine*. https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00178

Cuenca, A. G., Gentile, L. F., Lopez, M. C., Ungaro, R., Liu, H., Xiao, W., … Moldawer, L. L. (2013). Development of a genomic metric that can be rapidly used to predict clinical outcome in severely injured trauma patients. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318277131c

Cummings, C. J., Martin, T. R., Frevert, C. W., Quan, J. M., Wong, V. A., Mongovin, S. M., … Goodman, R. B. (1999). Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.

Czaikoski, P. G., Mota, J. M. S. C., Nascimento, D. C., Sônego, F., Castanheira, F. V. E. S., Melo, P. H., … Cunha, F. Q. (2016). Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148142

Czermak, B. J., Sarma, V., Pierson, C. L., Warner, R. L., Huber-Lang, M., Bless, N. M., … Ward, P. A. (1999). Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nature Medicine*. https://doi.org/10.1038/10512

Dalli, J., Chiang, N., & Serhan, C. N. (2015). Elucidation of novel 13-series resolvins that increase with atorvastatin and clear infections. *Nature Medicine*. https://doi.org/10.1038/nm.3911

Dare, A. J., Phillips, A. R. J., Hickey, A. J. R., Mittal, A., Loveday, B., Thompson, N., & Windsor, J. A. (2009). A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.019

Davenport, E. E., Burnham, K. L., Radhakrishnan, J., Humburg, P., Hutton, P., Mills, T. C., … Knight, J. C. (2016). Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: A prospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00046-1

Davey, M. S., Morgan, M. P., Liuzzi, A. R., Tyler, C. J., Khan, M. W. A., Szakmany, T., … Eberl, M. (2014). Microbe-Specific Unconventional T Cells Induce Human Neutrophil Differentiation into Antigen Cross-Presenting Cells. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401018

Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., … Walker, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature05115

Delano, M. J., Kelly-Scumpia, K. M., Thayer, T. C., Winfield, R. D., Scumpia, P. O., Cuenca, A. G., … Efron, P. A. (2011). Neutrophil Mobilization from the Bone Marrow during Polymicrobial Sepsis Is Dependent on CXCL12 Signaling. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100588

Delano, M. J., & Moldawer, L. L. (2009). Magic bullets and surrogate biomarkers circa 2009. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181a09440

Delano, M. J., Scumpia, P. O., Weinstein, J. S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K. M., … Moldawer, L. L. (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1 +CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *Journal of Experimental Medicine*. https://doi.org/10.1084/jem.20062602

Delano, M. J., Thayer, T., Gabrilovich, S., Kelly-Scumpia, K. M., Winfield, R. D., Scumpia, P. O., …

Moldawer, L. L. (2011). Sepsis Induces Early Alterations in Innate Immunity That Impact Mortality to Secondary Infection. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002104

Demaret, J., Dupont, G., Venet, F., Friggeri, A., Lepape, A., Rimmele´, T., … Monneret, G. (2015). STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study. *Journal of Leukocyte Biology*. https://doi.org/10.1189/jlb.5ab1114-545r

Desai, T. K., Carlson, R. W., & Geheb, M. A. (1988). Prevalence and clinical implications of hypocalcemia in acutely III patients in a medical intensive care setting. *The American Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1016/0002-9343(88)90415-9

Deshpande, A., Pasupuleti, V., & Rothberg, M. B. (2015). Statin therapy and mortality from sepsis: A meta-analysis of randomized trials. *American Journal of Medicine*, *128*(4), 410-417.e1. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2014.10.057

Dimas, A. S., Deutsch, S., Stranger, B. E., Montgomery, S. B., Borel, C., Attar-Cohen, H., … Antonarakis, S. E. (2009). Common regulatory variation impacts gene expression in a cell type-dependent manner. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1174148

Döcke, W. D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., … Kox, W. (1997). Monocyte deactivation in septic patients: Restoration by IFN-γ treatment. *Nature Medicine*. https://doi.org/10.1038/nm0697-678

Drewry, A., Samra, N., Skrupky, L., Fuller, B., Compton, S., & Hotchkiss, R. (2014). Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock*. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000234

Dries, D. J., Jurkovich, G. J., Maier, R. V., Clemmer, T. P., Struve, S. N., Weigelt, J. A., … Starko, K. M. (1994). Effect of Interferon Gamma on Infection-Related Death in Patients With Severe Injuries: A Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial. *Archives of Surgery*. https://doi.org/10.1001/archsurg.1994.01420340045008

Dror, I., Golan, T., Levy, C., Rohs, R., & Mandel-Gutfreund, Y. (2015). A widespread role of the motif environment in transcription factor binding across diverse protein families. *Genome Research*. https://doi.org/10.1101/gr.184671.114

Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., … Lochovsky, L. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature11247

Eash, K. J., Greenbaum, A. M., Gopalan, P. K., & Link, D. C. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*. https://doi.org/10.1172/JCI41649

Edwards, S. L., Beesley, J., French, J. D., & Dunning, M. (2013). Beyond GWASs: Illuminating the dark road from association to function. *American Journal of Human Genetics*. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.012

Efron, P. A., Martins, A., Minnich, D., Tinsley, K., Ungaro, R., Bahjat, F. R., … Moldawer, L. L. (2004). Characterization of the Systemic Loss of Dendritic Cells in Murine Lymph Nodes During Polymicrobial Sepsis. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3035

Emilsson, V., Thorleifsson, G., Zhang, B., Leonardson, A. S., Zink, F., Zhu, J., … Stefansson, K. (2008). Genetics of gene expression and its effect on disease. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature06758

Ernst, J., Kheradpour, P., Mikkelsen, T. S., Shoresh, N., Ward, L. D., Epstein, C. B., … Bernstein, B. E. (2011). Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature09906

Fairfax, B. P., Humburg, P., Makino, S., Naranbhai, V., Wong, D., Lau, E., … Knight, J. C. (2014). Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1246949

Farh, K. K. H., Marson, A., Zhu, J., Kleinewietfeld, M., Housley, W. J., Beik, S., … Bernstein, B. E. (2015). Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature13835

Faure, E., Equils, O., Sieling, P. A., Thomas, L., Zhang, F. X., Kirschning, C. J., … Arditi, M. (2000). Bacterial lipopolysaccharide activates NF-κB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11058

Finucane, H. K., Bulik-Sullivan, B., Gusev, A., Trynka, G., Reshef, Y., Loh, P. R., … Price, A. L. (2015). Partitioning heritability by functional annotation using genome-wide association summary statistics. *Nature Genetics*. https://doi.org/10.1038/ng.3404

Francisco-Cruz, A., Aguilar-Santelises, M., Ramos-Espinosa, O., Mata-Espinosa, D., Marquina-Castillo, B., Barrios-Payan, J., & Hernandez-Pando, R. (2014). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Not just another haematopoietic growth factor. *Medical Oncology*. https://doi.org/10.1007/s12032-013-0774-6

Freedman, M. L., Monteiro, A. N. A., Gayther, S. A., Coetzee, G. A., Risch, A., Plass, C., … Mills, I. G. (2011). Principles for the post-GWAS functional characterization of cancer risk loci. *Nature Genetics*. https://doi.org/10.1038/ng.840

Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., … Makowski, L. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: Glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522037

Fullerton, J. N., & Gilroy, D. W. (2016). Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.39

Gabanyi, I., Muller, P. A., Feighery, L., Oliveira, T. Y., Costa-Pinto, F. A., & Mucida, D. (2016). Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell*. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.023

Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/nri3175

Gao, X., Tsang, J. C. H., Gaba, F., Wu, D., Lu, L., & Liu, P. (2014). Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gku836

Gentile, L. F., Cuenca, A. G., Efron, P. A., Ang, D., Bihorac, A., McKinley, B. A., … Moore, F. A. (2012). Persistent inflammation and immunosuppression: A common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318256e000

Ghazalpour, A., Bennett, B., Petyuk, V. A., Orozco, L., Hagopian, R., Mungrue, I. N., … Lusis, A. J. (2011). Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genetics*. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001393

Giamarellos-Bourboulis, E. J. (2014). Natural killer cells in sepsis: Detrimental role for final outcome. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000352

Gibson, G., Powell, J. E., & Marigorta, U. M. (2015). Expression quantitative trait locus analysis for translational medicine. *Genome Medicine*. https://doi.org/10.1186/s13073-015-0186-7

Gilroy, D. W., & Vallance, P. (2005). Resolution for sepsis? *Circulation*, *111*(1), 2–4. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000152696.25879.CE

Grailer, J. J., Fattahi, F., Dick, R. S., Zetoune, F. S., & Ward, P. A. (2015). Cutting Edge: Critical Role for C5aRs in the Development of Septic Lymphopenia in Mice. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401193

Grailer, J. J., Kalbitz, M., Zetoune, F. S., & Ward, P. A. (2014). Persistent neutrophil dysfunction and suppression of acute lung injury in mice following cecal ligation and puncture sepsis. *Journal of Innate Immunity*. https://doi.org/10.1159/000362554

Grimaldi, D., Llitjos, J. F., & Pène, F. (2014). Post-infectious immune suppression: A new paradigm of severe infections. *Medecine et Maladies Infectieuses*. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.07.017

Grimaldi, D., Louis, S., Pène, F., Sirgo, G., Rousseau, C., Claessens, Y. E., … Chiche, J. D. (2011). Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Medicine*. https://doi.org/10.1007/s00134-011-2306-1

Grimaldi, David, Le Bourhis, L., Sauneuf, B., Dechartres, A., Rousseau, C., Ouaaz, F., … Pène, F. (2014). Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Medicine*. https://doi.org/10.1007/s00134-013-3163-x

Guo, Y., Conti, D. V., & Wang, K. (2015). Enlight: Web-based integration of GWAS results with biological annotations. *Bioinformatics*. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu639

Gutcher, I., & Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. https://doi.org/10.1172/JCI31720

Hall, M. W., Knatz, N. L., Vetterly, C., Tomarello, S., Wewers, M. D., Volk, H. D., & Carcillo, J. A. (2011). Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Medicine*. https://doi.org/10.1007/s00134-010-2088-x

Halstead, E. S., Carcillo, J. A., Schilling, B., Greiner, R. J., & Whiteside, T. L. (2013). Reduced frequency of CD56 dim CD16 pos natural killer cells in pediatric systemic inflammatory response syndrome/sepsis patients. *Pediatric Research*. https://doi.org/10.1038/pr.2013.121

Han, Y., Slivano, O. J., Christie, C. K., Cheng, A. W., & Miano, J. M. (2015). CRISPR-Cas9 genome editing of a single regulatory element nearly abolishes target gene expression in mice - Brief report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.305017

Heinz, S., Romanoski, C. E., Benner, C., Allison, K. A., Kaikkonen, M. U., Orozco, L. D., & Glass, C. K. (2013). Effect of natural genetic variation on enhancer selection and function. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature12615

Hnisz, D., Schuijers, J., Lin, C. Y., Weintraub, A. S., Abraham, B. J., Lee, T. I., … Young, R. A. (2015). Convergence of Developmental and Oncogenic Signaling Pathways at Transcriptional Super-Enhancers. *Molecular Cell*. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.014

Holtmeier, W., & Kabelitz, D. (2005). γδ T Cells Link Innate and Adaptive Immune Responses. In *Mechanisms of Epithelial Defense*. https://doi.org/10.1159/000086659

Hotchkiss, R. S., & Sherwood, E. R. (2015). Getting sepsis therapy right. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.aaa8334

Hotchkiss, Richard S., Coopersmith, C. M., & Karl, I. E. (2005). Prevention of Lymphocyte Apoptosis—A Potential Treatment of Sepsis? *Clinical Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1086/431998

Hotchkiss, Richard S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/nri3552

Hotchkiss, Richard S., & Nicholson, D. W. (2006). Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/nri1943

Hotchkiss, Richard S., Osmon, S. B., Chang, K. C., Wagner, T. H., Coopersmith, C. M., & Karl, I. E. (2005). Accelerated Lymphocyte Death in Sepsis Occurs by both the Death Receptor and Mitochondrial Pathways. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.5110

Hotchkiss, Richard S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Mechanisms of disease: Cell

death. *New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMra0901217

Hotchkiss, Richard S., Swanson, P. E., Cobb, J. P., Jacobson, A., Buchman, T. G., & Karl, I. E. (1997). Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: Findings in normal and T- and B-celldeficient mice. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/00003246-199708000-00015

Hotchkiss, Richard S., Swanson, P. E., Freeman, B. D., Tinsley, K. W., Cobb, J. P., Matuschak, G. M., … Karl, I. E. (1999). Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/00003246-199907000-00002

Hotchkiss, Richard S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E., Grayson, M. H., Osborne, D. F., Wagner, T. H., … Karl, I. E. (2002). Depletion of Dendritic Cells, But Not Macrophages, in Patients with Sepsis. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2493

Hotchkiss, Richard S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E., Schmieg, R. E., Hui, J. J., Chang, K. C., … Karl, I. E. (2001). Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4 + T Lymphocytes in Humans . *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.11.6952

Hotchkiss, Richard S, Coopersmith, C. M., Mcdunn, J. E., & Ferguson, T. A. (2009). Tilting toward immunosuppression. *Nature*, *15*(5), 496–497. https://doi.org/10.1038/nm0509-496.Tilting

Hotchkiss, Richard S, Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., & Vincent, J.-L. (2017). Sepsis and septic shock HHS Public Access. *Nature Review Disease Primers*, *2*(16045), 1–47. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45

Howie, B. N., Donnelly, P., & Marchini, J. (2009). A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genetics*. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000529

Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010

Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., … Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*. https://doi.org/10.1038/nbt.2647

Huber-Lang, M. S., Sarma, J. V., McGuire, S. R., Lu, K. T., Guo, R. F., Padgaonkar, V. A., … Ward, P. A. (2001). Protective effects of anti-C5a peptide antibodies in experimental sepsis. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.

Huber-Lang, M., Sarma, V. J., Lu, K. T., McGuire, S. R., Padgaonkar, V. A., Guo, R.-F., … Ward, P. A. (2001). Role of C5a in Multiorgan Failure During Sepsis. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1193

Hutchins, N. A., Unsinger, J., Hotchkiss, R. S., & Ayala, A. (2014). The new normal: Immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends in Molecular Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.002

Ince, C., Mayeux, P. R., Nguyen, T., Gomez, H., Kellum, J. A., Ospina-Tascón, G. A., … De Backer, D. (2016). The endothelium in sepsis. *Shock*. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000473

Inoue, S., Unsinger, J., Davis, C. G., Muenzer, J. T., Ferguson, T. A., Chang, K., … Hotchkiss, R. S. (2010). IL-15 Prevents Apoptosis, Reverses Innate and Adaptive Immune Dysfunction, and Improves Survival in Sepsis. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902307

Ishii, M., Wen, H., Corsa, C. A. S., Liu, T., Coelho, A. L., Allen, R. M., … Kunkel, S. L. (2009). Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood*. https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-217620

Janeway Jr., C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*.

Jensen, U. S., Knudsen, J. D., Wehberg, S., Gregson, D. B., & Laupland, K. B. (2011). Risk factors for recurrence and death after bacteraemia: A population-based study. *Clinical Microbiology and*

Infection. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03587.x

Jones, T. K., Fuchs, B. D., Small, D. S., Halpern, S. D., Hanish, A., Umscheid, C. A., … Mikkelsen, M. E. (2015). Post-acute care use and hospital readmission after sepsis. *Annals of the American Thoracic Society*. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201411-504OC

Kearns, N. A., Pham, H., Tabak, B., Genga, R. M., Silverstein, N. J., Garber, M., & Maehr, R. (2015). Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nature Methods*. https://doi.org/10.1038/nmeth.3325

Kelly-Scumpia, K. M., Scumpia, P. O., Delano, M. J., Weinstein, J. S., Cuenca, A. G., Wynn, J. L., & Moldawer, L. L. (2010). Type I interferon signaling in hematopoietic cells is required for survival in mouse polymicrobial sepsis by regulating CXCL10. *Journal of Experimental Medicine*. https://doi.org/10.1084/jem.20091959

Kelly-Scumpia, K. M., Scumpia, P. O., Weinstein, J. S., Delano, M. J., Cuenca, A. G., Nacionales, D. C., … Moldawer, L. L. (2011). B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *Journal of Experimental Medicine*. https://doi.org/10.1084/jem.20101715

Kempner, W. (1939). THE NATURE OF LEUKEMIC BLOOD CELLS AS DETERMINED BY THEIR METABOLISM. *Journal of Clinical Investigation*. https://doi.org/10.1172/jci101045

Kinter, A. L., Godbout, E. J., McNally, J. P., Sereti, I., Roby, G. A., O'Shea, M. A., & Fauci, A. S. (2008). The Common γ-Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6738

Koopman, F. A., Chavan, S. S., Miljko, S., Grazio, S., Sokolovic, S., Schuurman, P. R., … Tak, P. P. (2016). Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in Rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. https://doi.org/10.1073/pnas.1605635113

Kovach, M. A., & Standiford, T. J. (2012). The function of neutrophils in sepsis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283528c9b

Kox, M., & Pickkers, P. (2015). Modulation of the Innate Immune Response through the Vagus Nerve. *Nephron*. https://doi.org/10.1159/000435843

Kraft, K., Geuer, S., Will, A. J., Chan, W. L., Paliou, C., Borschiwer, M., … Andrey, G. (2015). Deletions, inversions, duplications: Engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Reports*. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.016

Landelle, C., Lepape, A., Voirin, N., Tognet, E., Venet, F., Bohé, J., … Monneret, G. (2010). Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Medicine*. https://doi.org/10.1007/s00134-010-1962-x

Lang, J. D., & Matute-Bello, G. (2009). Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans. *Critical Care (London, England)*.

Larsen, F. J., Schiffer, T. A., Weitzberg, E., & Lundberg, J. O. (2012). Regulation of mitochondrial function and energetics by reactive nitrogen oxides. *Free Radical Biology and Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.580

Lee, C. R., & Zeldin, D. C. (2015). Resolvin infectious inflammation by targeting the host response. *New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1511280

Leibovici, L. (2013). Long-term consequences of severe infections. *Clinical Microbiology and Infection*. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12160

Lerman, Y. V., Lim, K., Hyun, Y. M., Falkner, K. L., Yang, H., Pietropaoli, A. P., … Kim, M. (2014). Sepsis lethality via exacerbated tissue infiltration and TLR-induced cytokine production by neutrophils is integrin α3β1-dependent. *Blood*. https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-552943

Lévy, Y., Sereti, I., Tambussi, G., Routy, J. P., Lelièvre, J. D., Delfraissy, J. F., … Lederman, M. M.

(2012). Effects of recombinant human interleukin 7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: Results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study. *Clinical Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1093/cid/cis383

Li, M. J., Wang, L. Y., Xia, Z., Sham, P. C., & Wang, J. (2013). GWAS3D: Detecting human regulatory variants by integrative analysis of genome-wide associations, chromosome interactions and histone modifications. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gkt456

Liaudet, L., & Oddo, M. (2003). Role of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 in septic peritonitis. *Current Opinion in Critical Care*. https://doi.org/10.1097/00075198-200304000-00012

Lieschke, G. J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., … Dunn, A. R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*.

Limaye, A. P., Kirby, K. A., Rubenfeld, G. D., Leisenring, W. M., Bulger, E. M., Neff, M. J., … Boeckh, M. (2008). Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. https://doi.org/10.1001/jama.300.4.413

Link, D. C. (2005). Neutrophil homeostasis: A new role for stromal cell-derived factor-1. *Immunologic Research*. https://doi.org/10.1385/IR:32:1-3:169

Liu, Z. G., Ni, S. Y., Chen, G. M., Cai, J., Guo, Z. H., Chang, P., & Li, Y. S. (2013). Histones-Mediated Lymphocyte Apoptosis during Sepsis Is Dependent on p38 Phosphorylation and Mitochondrial Permeability Transition. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077131

Livingston, D. H., Appel, S. H., Wellhausen, S. R., Sonnenfeld, G., & Polk, H. C. (1988). Depressed Interferon Gamma Production and Monocyte HLA-DR Expression After Severe Injury. *Archives of Surgery*. https://doi.org/10.1001/archsurg.1988.01400350023002

Lu, H., Forbes, R. A., & Verma, A. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.M202487200

M.M., S. (2000). Signaling mechanisms of altered cellular responses in trauma, burn, and sepsis: Role of Ca2+. *Archives of Surgery*.

MacKall, C. L., Fry, T. J., & Gress, R. E. (2011). Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/nri2970

Makarenkova, V. P., Bansal, V., Matta, B. M., Perez, L. A., & Ochoa, J. B. (2006). CD11b + /Gr-1 + Myeloid Suppressor Cells Cause T Cell Dysfunction after Traumatic Stress . *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2085

Marshall, J. C. (2014). Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends in Molecular Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.007

Martin, G. S. (2012). Sepsis, severe sepsis and septic shock: Changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. https://doi.org/10.1586/eri.12.50

Mathias, B., Delmas, A. L., Ozrazgat-Baslanti, T., Vanzant, E. L., Szpila, B. E., Mohr, A. M., … Efron, P. A. (2017). Human myeloid-derived suppressor cells are associated with chronic immune suppression after severe sepsis/septic shock. *Annals of Surgery*. https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001783

Mathias, B., Szpila, B. E., Moore, F. A., Efron, P. A., & Moldawer, L. L. (2015). A review of GM-CSF therapy in sepsis. *Medicine (United States)*. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002044

Maurano, M. T., Humbert, R., Rynes, E., Thurman, R. E., Haugen, E., Wang, H., … Stamatoyannopoulos, J. A. (2012). Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1222794

Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology*. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934

McCabe, A., Zhang, Y., Thai, V., Jones, M., Jordan, M. B., & MacNamara, K. C. (2015). Macrophage-lineage cells negatively regulate the hematopoietic stem cell pool in response to interferon gamma at steady state and during infection. *Stem Cells*. https://doi.org/10.1002/stem.2040

McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B. G., Jenne, C. N., & Kubes, P. (2012). Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host and Microbe*. https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.011

McVicker, G., Van De Geijn, B., Degner, J. F., Cain, C. E., Banovich, N. E., Raj, A., … Pritchard, J. K. (2013). Identification of genetic variants that affect histone modifications in human cells. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1242429

Meier, I. D., Bernreuther, C., Tilling, T., Neidhardt, J., Wong, Y. W., Schulze, C., … Schachner, M. (2010). Short DNA sequences inserted for gene targeting can accidentally interfere with off-target gene expression. *FASEB Journal*. https://doi.org/10.1096/fj.09-140749

Meisel, C., Schefold, J. C., Pschowski, R., Baumann, T., Hetzger, K., Gregor, J., … Volk, H. D. (2009). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: A double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1164/rccm.200903-0363OC

Melis, J. P. M., Strumane, K., Ruuls, S. R., Beurskens, F. J., Schuurman, J., & Parren, P. W. H. I. (2015). Complement in therapy and disease. Regulating the complement system with antibody-based therapeutics. *Molecular Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.028

Michailidou, K., Hall, P., Gonzalez-Neira, A., Ghoussaini, M., Dennis, J., Milne, R. L., … Easton, D. F. (2013). Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nature Genetics*. https://doi.org/10.1038/ng.2563

Mikacenic, C., Hahn, W. O., Price, B. L., Harju-Baker, S., Katz, R., Kain, K. C., … Wurfel, M. M. (2015). Biomarkers of endothelial activation are associated with poor outcome in critical illness. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141251

Monneret, G., Venet, F., Pachot, A., & Lepape, A. (2008). Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: A new skin for the old ceremony. *Molecular Medicine*. https://doi.org/10.2119/2007-00102.Monneret

Monserrat, J., de Pablo, R., Diaz-Martín, D., Rodríguez-Zapata, M., de la Hera, A., Prieto, A., & Alvarez-Mon, M. (2013). Early alterations of B cells in patients with septic shock. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/cc12750

Morris, A. C., Brittan, M., Wilkinson, T. S., McAuley, D. F., Antonelli, J., McCulloch, C., … Simpson, A. J. (2011). C5a-mediated neutrophil dysfunction is RhoA-dependent and predicts infection in critically ill patients. *Blood*. https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-304667

Mostefai, H. A., Meziani, F., Mastronardi, M. L., Agouni, A., Heymes, C., Sargentini, C., … Andriantsitohaina, R. (2008). Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1164/rccm.200712-1835OC

Müller, Becker, Kränzlin, Schächinger, Huber, Nylèn, … Ritz. (2000). Disordered calcium homeostasis of sepsis: Association with calcitonin precursors. *European Journal of Clinical Investigation*. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2000.00714.x

Munoz, C., Carlet, J., Fitting, C., Misset, B., Blériot, J. P., & Cavaillon, J. M. (1991). Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *Journal of Clinical Investigation*. https://doi.org/10.1172/JCI115493

Nacionales, D. C., Gentile, L. F., Vanzant, E., Lopez, M. C., Cuenca, A., Cuenca, A. G., … Efron, P. A. (2014). Aged Mice Are Unable To Mount an Effective Myeloid Response to Sepsis. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302109

Nalos, M., Santner-Nanan, B., Parnell, G., Tang, B., McLean, A. S., & Nanan, R. (2012). Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1164/ajrccm.185.1.110

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/nri1785

Nelson, S., Heyder, A. M., Stone, J., Bergeron, M. G., Daugherty, S., Peterson, G., … Root, R. (2000). A Randomized Controlled Trial of Filgrastim for the Treatment of Hospitalized Patients with Multilobar Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1086/315775

Newsholme, E. A., Crabtree, B., & Ardawi, M. S. M. (1985). GLUTAMINE METABOLISM IN LYMPHOCYTES: ITS BIOCHEMICAL, PHYSIOLOGICAL AND CLINICAL IMPORTANCE. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. https://doi.org/10.1113/expphysiol.1985.sp002935

Newsholme, P., Curi, R., Gordon, S., & Newsholme, E. A. (1986). Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochemical Journal*. https://doi.org/10.1042/bj2390121

Nicolae, D. L., Gamazon, E., Zhang, W., Duan, S., Eileen Dolan, M., & Cox, N. J. (2010). Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: Annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS Genetics*. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000888

O'Sullivan, S. T., Lederer, J. A., Horgan, A. F., Chin, D. H. L., Mannick, J. A., Rodrick, M. L., … Galandiuk, S. (1995). Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Annals of Surgery*. https://doi.org/10.1097/00000658-199522240-00006

Ochoa, J. B., Bernard, A. C., O'Brien, W. E., Griffen, M. M., Maley, M. E., Rockich, A. K., … Morris, S. M. (2001). Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Annals of Surgery*. https://doi.org/10.1097/00000658-200103000-00014

Ogilvie, A. C., Groeneveld, A. B. J., Straub, J. P., & Thijs, L. G. (1991). Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intensive Care Medicine*. https://doi.org/10.1007/BF01708408

Ojeda Ojeda, M., Larrondo Muguercia, H., Magdariaga Figuerola, A., Sánchez Valdivia, A., Rodríguez Alonso, I., Valenzuela Silva, C., … Araña Rosaínz, M. D. J. (2011). Temporal trends of circulating nitric oxide and pro-inflammatory cytokine responses ex vivo in intra-abdominal sepsis: Results from a cohort study. *Inflammation Research*. https://doi.org/10.1007/s00011-010-0267-4

Ong, C. T., & Corces, V. G. (2014). CTCF: An architectural protein bridging genome topology and function. *Nature Reviews Genetics*. https://doi.org/10.1038/nrg3663

Opitz, B., Eitel, J., Meixenberger, K., & Suttorp, N. (2009). Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thrombosis and Haemostasis*. https://doi.org/10.1160/TH09-05-0323

OREN, R., FARNHAM, A. E., SAITO, K., MILOFSKY, E., & KARNOVSKY, M. L. (1963). Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *The Journal of Cell Biology*. https://doi.org/10.1083/jcb.17.3.487

Otto, G. P., Sossdorf, M., Claus, R. A., Rödel, J., Menge, K., Reinhart, K., … Riedemann, N. C. (2011). The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/cc10332

Pachot, A., Monneret, G., Voirin, N., Leissner, P., Venet, F., Bohé, J., … Lepape, A. (2005). Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.08.015

Pai, A. A., Pritchard, J. K., & Gilad, Y. (2015). The Genetic and Mechanistic Basis for Variation in Gene Regulation. *PLoS Genetics*. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004857

Paine, R., Standiford, T. J., Dechert, R. E., Moss, M., Martin, G. S., Rosenberg, A. L., … Hyzy, R. C.

(2012). A randomized Trial of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor for Patients with acute lung injury. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31822d7bf0

Palsson-Mcdermott, E. M., & O'Neill, L. A. J. (2013). The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. *BioEssays*. https://doi.org/10.1002/bies.201300084

Pastille, E., Didovic, S., Brauckmann, D., Rani, M., Agrawal, H., Schade, F. U., … Flohé, S. B. (2011). Modulation of Dendritic Cell Differentiation in the Bone Marrow Mediates Sustained Immunosuppression after Polymicrobial Sepsis. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001147

Pelletier, M., Ratthé, C., & Girard, D. (2002). Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: Role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases. *FEBS Letters*. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03668-2

Pène, F., Zuber, B., Courtine, E., Rousseau, C., Ouaaz, F., Toubiana, J., … Chiche, J.-D. (2008). Dendritic Cells Modulate Lung Response to Pseudomonas aeruginosa in a Murine Model of Sepsis-Induced Immune Dysfunction . *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8513

Perales, M. A., Goldberg, J. D., Yuan, J., Koehne, G., Lechner, L., Papadopoulos, E. B., … Van Den Brink, M. R. M. (2012). Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-437236

Petit, I., Ponomaryov, T., Zipori, D., & Tsvee, L. (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunology*. https://doi.org/10.1038/ni813

Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology*. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x

Prescott, H. C. (2016). Toward a Nuanced Understanding of the Role of Infection in Readmissions after Sepsis. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001508

Prescott, H. C., Dickson, R. P., Rogers, M. A. M., Langa, K. M., & Iwashyna, T. J. (2015). Hospitalization type and subsequent severe sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1164/rccm.201503-0483OC

Prescott, H. C., Langa, K. M., & Iwashyna, T. J. (2015). Readmission diagnoses after hospitalization for severe sepsis and other acute medical conditions. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. https://doi.org/10.1001/jama.2015.1410

Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Robbins, C. S., Weber, G. F., Etzrodt, M., Hilgendorf, I., … Swirski, F. K. (2012). Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1215173

Rittirsch, D., Flierl, M. A., & Ward, P. A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/nri2402

Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., … Kellis, M. (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature14248

Rodríguez-Prados, J.-C., Través, P. G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., … Boscá, L. (2010). Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901698

Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*. https://doi.org/10.1038/nri2939

Root, R. K., Lodato, R. F., Patrick, W., Cade, J. F., Fotheringham, N., Milwee, S., … Nelson, S. (2003). Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000048629.32625.5D

Rosas-Ballina, M., & Tracey, K. J. (2009). Cholinergic control of inflammation. *Journal of Internal Medicine*. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02098.x

Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H. D., Rao, N. A., Aghajanirefah, A., Matarese, F., … Stunnenberg, H. G. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1251086

Sahlén, P., Abdullayev, I., Ramsköld, D., Matskova, L., Rilakovic, N., Lötstedt, B., … Sandberg, R. (2015). Genome-wide mapping of promoter-anchored interactions with close to single-enhancer resolution. *Genome Biology*. https://doi.org/10.1186/s13059-015-0727-9

Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*. https://doi.org/10.1038/nbt.2842

Santos, S. S., Brunialti, M. K. C., Rigato, O., MacHado, F. R., Silva, E., & Salomao, R. (2012). Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock*. https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318257114e

Schaub, M. A., Boyle, A. P., Kundaje, A., Batzoglou, S., & Snyder, M. (2012). Linking disease associations with regulatory information in the human genome. *Genome Research*. https://doi.org/10.1101/gr.136127.111

Schmidt, E. M., Zhang, J., Zhou, W., Chen, J., Mohlke, K. L., Chen, Y. E., & Willer, C. J. (2015). GREGOR: Evaluating global enrichment of trait-associated variants in epigenomic features using a systematic, data-driven approach. *Bioinformatics*. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv201

Scumpia, P. O., Delano, M. J., Kelly-Scumpia, K. M., Weinstein, J. S., Wynn, J. L., Winfield, R. D., … Moldawer, L. L. (2007). Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. *Blood*. https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-087171

Scumpia, P. O., Delano, M. J., Kelly, K. M., O'Malley, K. A., Efron, P. A., McAuliffe, P. F., … Moldawer, L. L. (2006). Increased Natural CD4 + CD25 + Regulatory T Cells and Their Suppressor Activity Do Not Contribute to Mortality in Murine Polymicrobial Sepsis . *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7943

Scumpia, P. O., Kelly-Scumpia, K. M., Delano, M. J., Weinstein, J. S., Cuenca, A. G., Al-Quran, S., … Moldawer, L. L. (2010). Cutting Edge: Bacterial Infection Induces Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion in the Absence of TLR Signaling. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903652

Scumpia, P. O., McAuliffe, P. F., O'Malley, K. A., Ungaro, R., Uchida, T., Matsumoto, T., … Efron, P. A. (2005). CD11c + Dendritic Cells Are Required for Survival in Murine Polymicrobial Sepsis . *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3282

Serhan, C. N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature13479

Sexton, T., & Cavalli, G. (2015). The role of chromosome domains in shaping the functional genome. *Cell*. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.040

Singer, M. (2014). The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*. https://doi.org/10.4161/viru.26907

Smeekens, S. P., Ng, A., Kumar, V., Johnson, M. D., Plantinga, T. S., Van Diemen, C., … Xavier, R. J. (2013). Functional genomics identifies type i interferon pathway as central for host defense against Candida albicans. *Nature Communications*. https://doi.org/10.1038/ncomms2343

Søgaard, M., Thomsen, R. W., Bang, R. B., Schønheyder, H. C., & Nørgaard, M. (2015). Trends in length

of stay, mortality and readmission among patients with community-acquired bacteraemia. *Clinical Microbiology and Infection*. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.018

Song, S. K., Karl, I. E., Ackerman, J. J. H., & Hotchkiss, R. S. (1993). Increased intracellular Ca2+: A critical link in the pathophysiology of sepsis? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.3933

Song, X. M., Li, J. G., Wang, Y. L., Hu, Z. F., Zhou, Q., Du, Z. H., & Jia, B. H. (2008). The protective effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway against septic shock in rats. *Shock*. https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31816d5e49

Sørensen, O. E., & Borregaard, N. (2016). Neutrophil extracellular traps - The dark side of neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*. https://doi.org/10.1172/JCI84538

Soriano, F. G., Liaudet, L., Szabó, É., Virág, L., Mabley, J. G., Pacher, P., & Szabó, C. (2002). Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock*. https://doi.org/10.1097/00024382-200204000-00008

Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Parlato, M., Philippart, F., Misset, B., Cavaillon, J. M., Adib-Conquy, M., … Moucadel, V. (2012). Toll-like receptors expression and interferon-γ production by NK cells in human sepsis. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/cc11838

Spain, S. L., & Barrett, J. C. (2015). Strategies for fine-mapping complex traits. *Human Molecular Genetics*. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv260

Spec, A., Shindo, Y., Burnham, C. A. D., Wilson, S., Ablordeppey, E. A., Beiter, E. R., … Hotchkiss, R. S. (2016). T cells from patients with Candida sepsis display a suppressive immunophenotype. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/s13054-016-1182-z

Spitz, F., & Furlong, E. E. M. (2012). Transcription factors: From enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics*. https://doi.org/10.1038/nrg3207

Srinivasan, S., & Avadhani, N. G. (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021

Sun, A., Netzer, G., Small, D. S., Hanish, A., Fuchs, B. D., Gaieski, D. F., & Mikkelsen, M. E. (2016). Association between Index Hospitalization and Hospital Readmission in Sepsis Survivors. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001464

Sun, Q., Chen, X., Ma, J., Peng, H., Wang, F., Zha, X., … Zhang, H. (2011). Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. https://doi.org/10.1073/pnas.1014769108

Suzuki, K., Inoue, S., Kametani, Y., Komori, Y., Chiba, S., Sato, T., … Ogura, S. (2016). Reduced Immunocompetent B Cells and Increased Secondary Infection in Elderly Patients with Severe Sepsis. *Shock*. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000619

Szabo, P. A., Anantha, R. V., Shaler, C. R., McCormick, J. K., & Mansour Haeryfar, S. M. (2015). CD1d- and MR1-restricted T Cells in Sepsis. *Frontiers in Immunology*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00401

Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-Mcdermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., … O'Neill, L. A. J. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1β through HIF-1α. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature11986

Terashima, A., Okamoto, K., Nakashima, T., Akira, S., Ikuta, K., & Takayanagi, H. (2016). Sepsis-Induced Osteoblast Ablation Causes Immunodeficiency. *Immunity*. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.012

Tewhey R, Kotliar D, Park DS, Liu B, Winnicki S, Reilly SK, Andersen KG, Mikkelsen TS, Lander ES, Schaffner SF, Sabeti PC. (2016). Direct Identification of Hundreds of Expression-Modulating Variants using a Multiplexed Reporter Assay. *Cell*. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.027

THE ACTION OF LEUCOCYTES ON GLUCOSE. (1912). *The Journal of Biological Chemistry*.

Thompson, M., Kliewer, A., Maass, D., Becker, L., White, D. J., Bryant, D., … Giroir, B. P. (2000). Increased cardiomyocyte intracellular calcium during endotoxin-induced cardiac dysfunction in guinea pigs. *Pediatric Research*. https://doi.org/10.1203/00006450-200005000-00019

Toliver-Kinsky, T. E., Lin, C. Y., Herndon, D. N., & Sherwood, E. R. (2003). Stimulation of hematopoiesis by the Fms-like tyrosine kinase 3 ligand restores bacterial induction of Th1 cytokines in thermally injured mice. *Infection and Immunity*. https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3058-3067.2003

Tomasello, E., & Bedoui, S. (2013). Intestinal innate immune cells in gut homeostasis and immunosurveillance. *Immunology and Cell Biology*. https://doi.org/10.1038/icb.2012.85

Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., … Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690

Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature01321

Tracey, K. J. (2007). Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *Journal of Clinical Investigation*. https://doi.org/10.1172/JCI30555

Tracey, K. J. (2016). Reflexes in Immunity. *Cell*. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.018

Trynka, G., Hunt, K. A., Bockett, N. A., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., … Van Heel, D. A. (2011). Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nature Genetics*. https://doi.org/10.1038/ng.998

Ulloa, L. (2005). The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nature Reviews Drug Discovery*. https://doi.org/10.1038/nrd1797

Ulirsch JC, Nandakumar SK, Wang L, Giani FC, Zhang X, Rogov P, Melnikov A, McDonel P, Do R, Mikkelsen TS, Sankaran VG. (2016). Systematic Functional Dissection of Common Genetic Variation Affecting Red Blood Cell Traits. Cell. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.048

Unsinger, J., McGlynn, M., Kasten, K. R., Hoekzema, A. S., Watanabe, E., Muenzer, J. T., … Hotchkiss, R. S. (2010). IL-7 Promotes T Cell Viability, Trafficking, and Functionality and Improves Survival in Sepsis. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903151

Vachharajani, V., Liu, T., & McCall, C. E. (2014). Epigenetic coordination of acute systemic inflammation: Potential therapeutic targets. *Expert Review of Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.943192

van Westerloo, D. J., Giebelen, I. A. J., Florquin, S., Daalhuisen, J., Bruno, M. J., de Vos, A. F., … van der Poll, T. (2005). The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway Regulates the Host Response during Septic Peritonitis. *The Journal of Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1086/430323

van Ierssel, S. H., van Craenenbroeck, E. M., Hoymans, V. Y., Vrints, C. J., Conraads, V. M., & Jorens, P. G. (2013). Endothelium Dependent Vasomotion and In Vitro Markers of Endothelial Repair in Patients with Severe Sepsis: An Observational Study. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069499

Van Vught, L. A. V., Klouwenberg, P. M. C. K., Spitoni, C., Scicluna, B. P., Wiewel, M. A., Horn, J., … Van Der Poll, T. (2016). Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. https://doi.org/10.1001/jama.2016.2691

Vanhille L, Griffon A, Maqbool MA, Zacarias-Cabeza J, Dao LT, Fernandez N, Ballester B, Andrau JC, Spicuglia S. (2015). High-throughput and quantitative assessment of enhancer activity in mammals by CapStarr-seq. *nature communications* https://doi.org/10.1038/ncomms7905

Venet, F., Chung, C.-S., Monneret, G., Huang, X., Horner, B., Garber, M., & Ayala, A. (2008). Regulatory

T cell populations in sepsis and trauma. *Journal of Leukocyte Biology*. https://doi.org/10.1189/jlb.0607371

Venet, F., Chung, C. S., Kherouf, H., Geeraert, A., Malcus, C., Poitevin, F., … Monneret, G. (2009). Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25 +CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Medicine*. https://doi.org/10.1007/s00134-008-1337-8

Venet, F., Pachot, A., Debard, A.-L., Bohe, J., Bienvenu, J., Lepape, A., … Monneret, G. (2006). Human CD4 + CD25 + Regulatory T Lymphocytes Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Monocyte Survival through a Fas/Fas Ligand-Dependent Mechanism . *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6540

Voight, B. F., Kang, H. M., Ding, J., Palmer, C. D., Sidore, C., Chines, P. S., … Boehnke, M. (2012). The Metabochip, a Custom Genotyping Array for Genetic Studies of Metabolic, Cardiovascular, and Anthropometric Traits. *PLoS Genetics*. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002793

Walton, A. H., Muenzer, J. T., Rasche, D., Boomer, J. S., Sato, B., Brownstein, B. H., … Hotchkiss, R. S. (2014). Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098819

Wang, Haoyi, Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025

Wang, Hong, Liao, H., Ochani, M., Justiniani, M., Lin, X., Yang, L., … Ulloa, L. (2004). Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nature Medicine*. https://doi.org/10.1038/nm1124

Wang, J. F., Li, J. B., Zhao, Y. J., Yi, W. J., Bian, J. J., Wan, X. J., … Deng, X. M. (2015). Up-regulation of programmed cell death 1 ligand 1 on neutrophils may be involved in sepsis-induced immunosuppression: An animal study and a prospective case-control study. *Anesthesiology*. https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000525

Wang, J., Zhuang, J., Iyer, S., Lin, X. Y., Greven, M. C., Kim, B. H., … Weng, Z. (2013). Factorbook.org: A Wiki-based database for transcription factor-binding data generated by the ENCODE consortium. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gks1221

Wang, T., Derhovanessian, A., De Cruz, S., Belperio, J. A., Deng, J. C., & Hoo, G. S. (2014). Subsequent infections in survivors of sepsis: Epidemiology and outcomes. *Journal of Intensive Care Medicine*. https://doi.org/10.1177/0885066612467162

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309

Ward, L. D., & Kellis, M. (2012). HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gkr917

Ward, P. A. (2010). The harmful Role of C5a on innate immunity in sepsis. *Journal of Innate Immunity*. https://doi.org/10.1159/000317194

Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q., & Papayannopoulos, V. (2015). Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.aaa8064

Weber, G. F., Chousterman, B. G., He, S., Fenn, A. M., Nairz, M., Anzai, A., … Swirski, F. K. (2015). Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.aaa4268

Webster, D. E., Barajas, B., Bussat, R. T., Yan, K. J., Neela, P. H., Flockhart, R. J., … Khavari, P. A. (2014). Enhancer-targeted genome editing selectively blocks innate resistance to oncokinase inhibition. *Genome Research*. https://doi.org/10.1101/gr.166231.113

Westra, H. J., Peters, M. J., Esko, T., Yaghootkar, H., Schurmann, C., Kettunen, J., … Franke, L. (2013).

Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nature Genetics*. https://doi.org/10.1038/ng.2756

Wongsrichanalai, C., Namsiripongpun, V., Pornsilapatip, J., Kyle, D. E., & Wilde, H. (1992). Sensitivity of QBC malaria test. *The Lancet*. https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92333-B

Wu, H. P., Chung, K., Lin, C. Y., Jiang, B. Y., Chuang, D. Y., & Liu, Y. C. (2013). Associations of T helper 1, 2, 17 and regulatory T lymphocytes with mortality in severe sepsis. *Inflammation Research*. https://doi.org/10.1007/s00011-013-0630-3

Xiao, W., Mindrinos, M. N., Seok, J., Cuschieri, J., Cuenca, A. G., Gao, H., … Wong, W. H. (2011). A genomic storm in critically injured humans. *Journal of Experimental Medicine*. https://doi.org/10.1084/jem.20111354

Yang, L., Zhou, T., Dror, I., Mathelier, A., Wasserman, W. W., Gordân, R., & Rohs, R. (2014). TFBSshape: A motif database for DNA shape features of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1087

Yao, L., Berman, B. P., & Farnham, P. J. (2015). Demystifying the secret mission of enhancers: Linking distal regulatory elements to target genes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1087961

Yao, L., Shen, H., Laird, P. W., Farnham, P. J., & Berman, B. P. (2015). Inferring regulatory element landscapes and transcription factor networks from cancer methylomes. *Genome Biology*. https://doi.org/10.1186/s13059-015-0668-3

Yao, L., Tak, Y. G., Berman, B. P., & Farnham, P. J. (2014). Functional annotation of colon cancer risk SNPs. *Nature Communications*. https://doi.org/10.1038/ncomms6114

Zaloga, G. P., Washburn, D., Black, K. W., & Prielipp, R. (1993). Human sepsis increases lymphocyte intracellular calcium. *Critical Care Medicine*. https://doi.org/10.1097/00003246-199302000-00009

Zanin-Zhorov, A., Cahalon, L., Tal, G., Margalit, R., Lider, O., & Cohen, I. R. (2006). Heat shock protein 60 enhances CD4+CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *Journal of Clinical Investigation*. https://doi.org/10.1172/JCI28423

Zhang, X., Johnson, A. D., Hendricks, A. E., Hwang, S. J., Tanriverdi, K., Ganesh, S. K., … O'Donnell, C. J. (2014). Genetic associations with expression for genes implicated in GWAS studies for atherosclerotic cardiovascular disease and blood phenotypes. *Human Molecular Genetics*. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt461

Zhang, Y., Li, J., Lou, J., Zhou, Y., Bo, L., Zhu, J., … Deng, X. (2011). Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Critical Care*. https://doi.org/10.1186/cc10059

Zivin, J. R., Gooley, T., Zager, R. A., & Ryan, M. J. (2001). Hypocalcemia: A pervasive metabolic abnormality in the critically ill. *American Journal of Kidney Diseases*. https://doi.org/10.1016/S0272-6386(01)80116-5

Résumé:

En 2017, l'Assemblée mondiale de la Santé et l'Organisation mondiale de la Santé ont fait du sepsis une priorité de santé mondiale en adoptant une résolution pour améliorer, prévenir, diagnostiquer et gérer le sepsis. Cette pathologie tue une personne dans le monde toutes les 3,5 secondes principalement des personnes déjà fragilisées comme les nouveau-nés ou les personnes âgées mais aussi les patients ayant subis des interventions médicales. Il a été démontré que l'état du patient et la réponse immunitaire de l'hôte est primordiale dans le développement de la pathologie. Une meilleure compréhension des bases moléculaires et cellulaires de la maladie est nécessaire. Bien que souvent remis en cause, l'utilisation du modèle murin permet de mimer la physiopathologie du sepsis humain.

Mon projet de thèse a consisté à étudier la réponse transcriptionelle des cellules péritonéales. Pour cela une inflammation stérile a été provoquée par injection de LPS, issus de Pseudomonas aeruginosa, dans le péritoine de la souris. La réponse des cellules péritonéales de ces souris a été étudiée au cours du pic inflammatoire et juste avant la mort, puis ces résultats ont été comparés aux données moléculaires issues de patients atteints du sepsis. Les résultats nous ont permis de montrer que le modèle souris reflète en partie les observations faites chez les patients. Ceci permet d'envisager des études dans ce modèle pour documenter des relations de cause à effet et de tester notamment le rôle de certains gènes dans la physiopathologie.

De plus, j'ai recherché des polymorphismes qui pourraient à la fois altérer le niveau d'expression de gènes et modifier la survie de patients atteints de sepsis. Depuis l'avènement des études d'association à l'échelle du génome, un nombre important de polymorphismes (SNP) ont été identifiés comme étant associés à un phénotype ou à une pathologie. Chacun de ces SNPs est un "tag SNP" car des centaines de variants en déséquilibre de liaison génétique sont hérités en même temps. Pour établir la causalité d'un variant génétique associé à la maladie, il faut démontrer clairement son effet à l'échelle moléculaire et prouver un lien avec la maladie.

Par une approche GWAS, nous avons identifié au laboratoire 139 SNPs associés à la mortalité précoce (avant 7 jours) ou tardive (entre 7 et 28 jours) dans une cohorte de 832 patients atteints de sepsis. J'ai identifié 1450 SNPs en fort déséquilibre de liaison avec les SNPs associés, dont 1439 se situent dans des régions non codantes proches de gènes. Dans le but d'identifier les SNPs causaux pouvant avoir un rôle régulateur et de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'association de ces polymorphismes, j'ai caractérisé les effets cis-régulateurs de ces SNPs par des approches bio-informatiques et des approches fonctionnelles expérimentales.

J'ai identifié ceux qui se situent dans des régions régulatrices comme les enhancers, les silencers ou les promoteurs et qui pourraient ainsi moduler l'expression des gènes. J'ai ainsi priorisé les SNPs et sélectionné le meilleur SNP candidat pour une validation expérimentale. J'ai utilisé la technique de Crispr-Cas9 et la technique du gène rapporteur pour tester d'une part la fonction de la région contenant le SNP et d'autre part l'effet du SNP lui-même. Les résultats montrent que la région contenant rs143356980 a une activité enhancer sur le gène CISH dans des cellules stimulées ou non par le IFN-gamma ou le LPS. Ils montrent aussi que rs143356980 modifie cette activité dans des cellules stimulées ou non par le IFN-gamma.

Ces 2 projets mettent en évidence des mécanismes de régulation de gènes clés potentiellement impliqués dans la survie des patients atteints de sepsis.